BESTIMMUNG VON MORPHINKONZENTRATIONEN IM GEHIRN VON NAGERN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON TOLERANZ – UND ABHÄNGIGKEITSMECHANISMEN

Gabriele Meyer

1979

BESTIMMUNG VON MORPHINKONZENTRATIONEN IM GEHIRN VON NAGERN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON TOLERANZ- UND ABHÄNGIGKEITSMECHANISMEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Gabriele Meyer

München

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Herz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schönenberger

Tag der mündlichen Prüfung: 2o. 7. 1979

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München in der Abteilung Neuropharmakologie ausgeführt.

Herrn Professor Dr. H. Schönenberger danke ich für die wohlwollende Unterstützung dieser Arbeit.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von Herrn Professor Dr. A. Herz, dem ich für die wissenschaftliche Anleitung und Betreuung zu großem Dank verpflichtet bin.

Herrn Dr. C. Gramsch danke ich für anregende Diskussionen bei der Durchführung der gaschromatographischen Analyse.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. J. Bläsig für viele wertvolle Hinweise.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0050

Meinen Eltern und meinem Onkel gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS Seite

1. Einleitung 1

2. Allgemeine Problemstellung 9

3. Ergebnisse 14

3.1. Einführung in Extraktions- und Nachweismethoden für Morphin 14

3.2. Extraktion von Morphin aus Gehirn 21

3.3. Gaschromatographische Bestimmung von Morphin 23

3.3.1. Derivatisierung von Morphin 23

3.3.2. Messung und Auswertung 26

3.3.3. Störfaktoren 33

3.4. Radioimmunoassay für Morphin 36

3.4.1. Messung und Auswertung 36

3.4.2. Spezifität des Antiserums 43

3.5. Vergleich der gaschromatographischen Bestimmungsmethode mit dem Radioimmunoassay 45

3.6. Anwendung der Bestimmungsmethoden auf bestimmte biologische Fragestellungen 50

3.6.1. Spezielle Problemstellung 50

3.6.2. Charakterisierung des Toleranzmechanismus an Hand einer auf dem Massenwirkungsgesetz beruhenden Analyse von Konzentrations-Wirkungskurven für Morphin-induzierte Analgesie 58

3.6.2.1. Veränderungen in der Gestalt von Dosis-Wirkungskurven bei Zunahme der Toleranz 58

3.6.2.2. Ausschluß pharmakokinetischer Ursachen für die beobachteten Gestaltsveränderungen der Dosis-Wirkungskurven 63

3.6.2.3. Analyse der den Dosis-Wirkungskurven zugrundeliegenden Veränderungen 67

3.6.2.4. Diskussion anhand einer sogenannten best-fit Computer Analyse der vorhandenen Daten 72

3.6.3. Veränderungen im Verlauf von Dosis-Wirkungskurven für ein, durch einen Morphin-Antagonisten provoziertes, Entzugssymptom bei Zunahme der körperlichen Abhängigkeit 77

3.6.3.1. Einleitende Bemerkungen 77

3.6.3.2. Veränderungen der Dosis-Wirkungskurven für Naloxon-induziertes Jumping bei zunehmender Toleranz/Abhängigkeit 78

3.6.3.3. Diskussion 83

3.6.4. Wirkung von Naloxon auf den Morphinspiegel im Gehirn naiver (d.h. nicht chronisch mit Morphin vorbehandelter) und tolerant/abhängiger Mäuse 85

4. Abschließende Diskussion 95

5. Experimenteller Teil 101

5.1. Verwendete Materialien und Substanzen 101

5.2. Methoden der Analysen 102

5.2.1. Gaschromatographie 102

5.2.2. Radioimmunoassay 105

5.3. Tierversuche 108

5.3.1. Entwicklung von körperlicher Abhängigkeit bzw. Toleranz 108

5.3.2. Messung der Toleranz anhand der antinozeptiven Wirkung des Morphins 110

5.3.3. Messung des Entzugssymptoms Jumping 111

5.3.4. Intraventrikuläre Injektion 111

5.3.5. Auswertung mit Hilfe einer best-fit Computer Analyse 112

6. Zusammenfassung 114

7. Literatur 117

1. EINLEITUNG

Opium, der eingetrocknete Milchsaft des Schlafmohns (Papaver somniferum), wurde schon im Altertum als Narkotikum und Hypnotikum verwandt. Die im Opium enthaltenen Wirkstoffe bestehen aus zwei pharmakologisch deutlich unterscheidbaren Klassen von Alkaloiden: Substanzen mit Phenantrenstruktur (Morphin, Codein, Thebain) und Substanzen mit Benzylisochinolinstruktur (Papaverin, Noscapin). Diejenigen Substanzen, die eine morphinähnliche Wirkung besitzen, werden Opiate genannt. (Zu den Opiaten zählen aber auch synthetisch hergestellte Substanzen, sofern sie morphinähnliche Wirkung besitzen und sich aus dem Morphinmolekül herleiten lassen. Substanzen, die zwar opiatartige Wirkungen haben, sich aber nicht aus dem Morphinmolekül ableiten lassen - wie z.B. die kürzlich entdeckten Endorphine - werden unter dem Sammelbegriff "Opioide" zusammengefaßt).

Morphin wurde als erstes Alkaloid von dem Apotheker Sertürner 1803 isoliert. Erst 1925 wurde die chemische Struktur von Gulland und Robinson aufgeklärt; sie konnte 1952 von Gates und Tschudi anhand der Synthese bestätigt werden. In den folgenden Jahren wurden viele ähnlich wirkende halb- oder vollsynthetische Opiate hergestellt; einige von ihnen sind bis zu 1000mal stärker wirksam als

Morphin. Die meisten dieser Opiate besitzen eine charakteristische Grundstruktur mit folgenden Strukturmerkmalen: a) ein tertiärer Stickstoff, b) ein quartäres Kohlenstoffatom, das vom basischen Stickstoff durch eine Äthylenkette ($-CH_2-CH_2-$) getrennt ist, c) ein elektrophiles Kohlenstoffatom, an dem eine phenolische Hydroxylgruppe oder eine Ketogruppe haftet. Die durch das optisch aktive C-Atom bedingten Stereoisomeren unterscheiden sich in ihren spezifischen, opiatartigen Wirkungen; so ist von den Antipoden im allgemeinen das linksdrehende Isomer viel stärker wirksam als das rechtsdrehende.

Diese spezifischen Strukturmerkmale (sowie eine Reihe weiterer Charakteristika der Opiatwirkung) haben zur Forderung spezieller Rezeptoren für diese Substanzklasse geführt. Die Existenz solcher Opiatrezeptoren hat sich in jüngster Zeit durch Bindungsstudien in vitro und in vivo zeigen lassen und führte schließlich zur Entdeckung körpereigener Liganden dieser Rezeptoren.

Die einzigartige Wirkung der Opiate auf das Zentralnervensystem, die Hemmung stärkster Schmerzen, ohne nennenswerte Beeinflussung des Bewußtseins, macht diese Substanzklasse als Analgetika unentbehrlich. Gleichzeitig besitzen die Opiate jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen wie z.B. Atemdepression, Blutdruck- und Temperaturabfall, sowie

Obstipation und Pupillenverengung. Daneben kommt es aber auch nach Opiateinnahme zu psychischen Veränderungen. Während erstmalige Verabfolgung oft sogar als unangenehm empfunden wird und mit Übelkeit einhergehen kann, tritt bei Wiederholung der Applikation eine angenehme Beeinflussung der allgemeinen Stimmungslage in den Vordergrund, welche den Wunsch nach Wiederholung weckt.

Bei chronischer Verabreichung eines Opiates verringert sich zunehmend seine Wirksamkeit. Es kommt zur Gewöhnung (Toleranz), d.h. es werden immer höhere Dosen erforderlich, um eine gleichstarke Wirkung wie zu Beginn der Verabfolgung zu erzielen. Dieser Wirksamkeitsverlust ist nicht auf beschleunigten Abbau oder schnellere Ausscheidung der Substanz zurückzuführen. Vielmehr adaptiert sich der Körper an die fortwährende Opiatzufuhr durch Aktivierung kompensatorischer Mechanismen. Dadurch kommt es schließlich zu einem neuen Funktionsgleichgewicht (siehe später). Der Körper ist damit vom Pharmakon abhängig geworden. Diese Abhängigkeit ist maskiert, solange das Opiat sich im Körper befindet; sie zeigt sich aber im Auftreten von Entzugserscheinungen, sobald die Opiatzufuhr unterbrochen wird. Entzugssymptome stellen ein Spiegelbild der akuten Opiatwirkungen dar, was zu erwarten ist, wenn man annimmt, daß sich im Entzug die

die akuten Opiatwirkungen neutralisierenden Gegenregulationsmechanismen manifestieren (siehe später). Zu einem solchen Entzugssyndrom kommt es nicht nur nach Unterbrechung der Opiatzufuhr sondern auch nach Applikation spezifischer Morphinantagonisten. Diese Antagonisten, die mit Morphin chemisch eng verwandt sind, besitzen praktisch keine Eigenwirkungen, sind jedoch in der Lage, die Wirkungen des Morphins aufzuheben. Untersuchungen über die Wechselwirkung von Morphinagonisten und -antagonisten zeigten, daß beide Substanzen kompetitiv an demselben Rezeptor angreifen; während Agonisten imstande sind, durch ihre Bindung eine Konformationsänderung des Rezeptors zu bewirken, welche die Reaktionskette in Gang setzt, die schließlich zur pharmakologischen Wirkung führt, vermögen Antagonisten offenbar lediglich die Bindungsstelle für den Agonisten zu blockieren (Goldstein, 1974).

Die Mechanismen, die zur Toleranz und Abhängigkeit führen, sind bis heute nicht letztlich aufgeklärt. Es gibt jedoch eine Reihe von Theorien über die Ursache dieser Phänomene. Die Grundlage aller dieser Hypothesen liefert die erstmalig von Himmelsbach (1943) formulierte Homöostasetheorie (Abb. 1). Danach soll Morphin das funktionelle Gleichgewicht autonomer Zentren im Hypothalamus stören: das durch Morphin gestörte Gleichgewicht der Körperfunktionen

wird nach dieser Theorie durch Aktivierung kompensatorischer Mechanismen wiederhergestellt. Wird das Morphin dann entzogen, so bekommt der Kompensationsmechanismus das Übergewicht; dies manifestiert sich in einem bis dahin latent gebliebenen Zustand "autonomer Übererregbarkeit", d.h. es kommt zu Entzugserscheinungen.

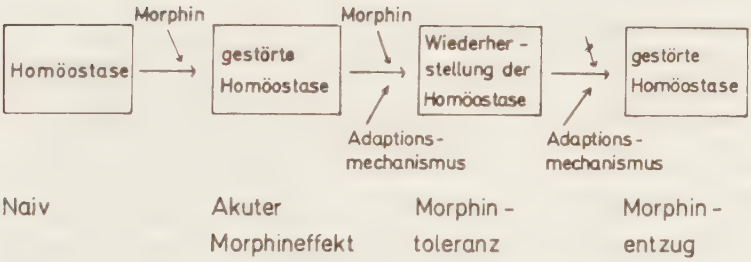


Abb. 1: Schematische Darstellung der Homöostasetheorie der Morphintoleranz und -abhängigkeit (Kuschinsky, 1977).

Neuere Theorien versuchen solche Kompensationsmechanismen auf zellulärer Ebene zu erklären. Es wird vermutet, daß bei einer durch Morphin ausgelösten Störung der Homöostase der Einzelzelle die Zelle eigene Kontrollsysteme aktiviert, um dieser Störung zu begegnen.

Würde Morphin zum Beispiel die Erregungsübertragung an Synapsen durch Verminderung der Transmitterausschüttung oder durch Blockierung der postsynaptischen Reizantwort verhindern, so könnten diese Morphin-Folgereaktionen dadurch aufgehoben werden, daß die Zelle mehr Transmitter synthetisiert oder die postsynaptische Membran empfindlicher für die Transmitterreizantwort wird. Zu Verfechtern dieser Theorie gehören Goldstein (1961), Shuster (1961) und Jaffe und Sharpless (1968).

Andere Theorien gehen davon aus, daß sich nicht die durch die Morphin-Rezeptor Interaktion ausgelöste Folgereaktion verändert, sondern die Interaktion des Opiates mit dem Rezeptor selbst. So wäre es denkbar, daß sich bei fortwährender Opiatanwesenheit am Rezeptor die Anzahl der (pharmakologischen) Opiatrezeptoren vermindert, oder die Anzahl sogenannter silent receptors (Collier, 1966) vermehrt. Veränderungen in der Anzahl von Rezeptoren sind schon bei Transmittern bekannt. So wurde davon berichtet, daß infolge chronischer Denervierung der Skelettmuskulatur und anderer peripherer Organe die Anzahl von Acetylcholinrezeptoren ansteigt (denervation supersensitivity, Axelson und Thessleff, 1959).

Andererseits wäre es vorstellbar, daß sich die Opiatrezeptoren qualitativ verändern, indem sie ihre Bindungs-

eigenschaften dem Opiat gegenüber vermindern. Diese Hypothese ließe sich zum Beispiel durch eine Art von Autoantagonismus erklären, bei dem die Wechselwirkung der Opiate zum Rezeptor durch die Opiate selber reduziert wird (Schmidt und Livingston, 1933). Danach würde eine dauernde Besetzung der Rezeptoren, bedingt durch chronisch hohe Opiatkonzentrationen, eine erneute Stimulation verhindern.

Ein anderes Modell basiert auf der Beobachtung, daß Natriumionen die Rezeptorbindung der Opiatagonisten erniedrigen, die der Opiatantagonisten aber erhöhen. Daher wäre es denkbar, daß der Opiatrezeptor in zwei Konformationen existiert, der Natrium abhängigen, die insbesondere Antagonisten bindet und der nicht Natrium abhängigen, die mehr Agonisten bindet. Bei chronischer Opiatpräsenz würde sich dann dieses Gleichgewicht zugunsten der Natrium abhängigen Form verschieben (Snyder, 1975).

Sowohl die Veränderungen in der Relation von agonistischer und antagonistischer Rezeptorform als auch der oben erwähnte Autoantagonismus würden zu einer Affinitätsverminderung führen. Anhand dieser beiden Theorien ließe sich zwar nicht das Auftreten von Abstinenzerscheinungen, wohl aber die Abnahme in der pharmakologischen Wirkung der Opiate erklären.

Es war das Ziel dieser Arbeit, bestimmte Fragestellungen, insbesondere in Hinblick auf eventuelle qualitative Veränderungen der Opiatrezeptoren, zu untersuchen. Die Ausarbeitung von Methoden zur Bestimmung kleinster Morphindosen war hierbei eine wesentliche Voraussetzung.

2. ALLGEMEINE PROBLEMSTELLUNG

Die Frage, ob die Toleranzentwicklung gegenüber Morphin durch quantitative oder qualitative Veränderungen der Opiatrezeptoren verursacht wird, läßt sich auf zwei verschiedene Arten von Versuchsanordnungen studieren. Zum einen stehen dafür direkte Bindungsstudien zur Verfügung, zum anderen kann über die Wirkungen, die durch das Opiat induziert werden, eine indirekte Aussage über das Geschehen am Rezeptor gemacht werden.

Bei den direkten Bindungsstudien wird die Wechselwirkung zwischen einem Pharmakon und seinem spezifischen Rezeptor in vitro an Gewebehomogenaten untersucht. Die Messung einer solchen spezifischen Rezeptorinteraktion ist nur dadurch möglich, daß hochaffine, hochradioaktiv markierte Substanzen zur Verfügung stehen, die es erlauben, Bindungsversuche bei so niedrigen Konzentrationen durchzuführen, daß die unspezifische Bindung im Vergleich zur spezifischen verhältnismäßig niedrig ist. Zur näheren Charakterisierung der spezifischen Bindung werden Verdrängungsstudien durchgeführt, bei denen diese hochaffinen und radioaktiv markierten Substanzen mit nicht markierten spezifischen Substanzen um die Bindungsstelle am Rezeptor konkurrieren.

Die Vorteile dieser in vitro durchgeführten Bindungsstudien bestehen darin, daß sowohl die Zahl der Rezeptoren gemessen werden kann, als auch direkte Aussagen über die Qualität der Bindung gemacht werden können.

Ein Hauptnachteil dieser Methode ist dagegen, daß die Bestimmungen in vitro an Homogenaten durchgeführt werden, und somit mögliche Veränderungen in der Opiat-Rezeptorbindung durch die Prozedur des Homogenisierens eventuell verloren gehen könnten. Rückschlüsse auf die in vivo Situation sind also bei Anwendung solcher Methoden nur bedingt möglich. Deshalb ist es wichtig, solche in vitro gewonnenen Studien wenn möglich durch in vivo Untersuchungen zu ergänzen.

Im lebenden Organismus gibt es die Möglichkeit, rückläufig von der biologischen Konsequenz, das heißt von dem zu beobachtenden biologischen Effekt, auf die Pharmakon-Rezeptor-Wechselwirkung zu schließen. Hierbei geht man von der Annahme aus, daß die Wechselwirkung zwischen Pharmakon und Rezeptor den aus der Enzymologie entnommenen Gesetzmäßigkeiten des einfachen Massenwirkungsgesetzes unterliegen.

$$y = \frac{\alpha}{1 + \frac{K_D}{x}}$$

Dieses Gesetz beinhaltet, daß die Intensität des biologischen Effektes (y) in bestimmtem Proportionalitätszusammenhang zur Reizstärke steht und die Reizstärke wiederum proportional der Menge des gebildeten Pharmakon-Rezeptor-Komplexes bzw. proportional der verabreichten Dosis (x) ist; eine maximale Rezeptorbindung löst dann den maximalen Reiz (α) aus. Da nach diesem Gesetz die Dissoziationskonstante (K_D) bei halbmaximaler Wirkung gleich der Dosis der halbmaximalen Wirkung ist, und da der negative Kehrwert der Dissoziationskonstanten ($\frac{1}{K_D}$) die Affinität des Pharmakons zum Rezeptor angibt, läßt sich über die Dosis der halbmaximalen Wirkung somit direkt die Affinität des Pharmakons zum Rezeptor ermitteln. Unter der Voraussetzung, daß wirklich Proportionalität zwischen Wirkung und Rezeptorbesetzung vorliegt - das Maximum einer sigmoidalen Kurve also tatsächlich maximale Rezeptorbesetzung reflektiert - läßt sich dann aus der Position einer sigmoidalen Kurve auf der x-Achse genau die Affinität des Pharmakons zum Rezeptor ermitteln und aus der Höhe des Maximaleffektes die Anzahl der Rezeptoren. Durch Analyse der Dosis-Effekt-Kurven ist es somit möglich, Rückschlüsse auf die Pharmakon-Rezeptor-Wechselwirkung zu ziehen.

Gewöhnlich werden solche über Dosis-Wirkungsbeziehungen erhaltene Rezeptorstudien an isolierten Geweben durchgeführt, die durch Aufbewahrung in einer physiologischen

Flüssigkeit am Leben gehalten werden. Solche in vitro durchgeführten Studien haben den Vorteil, daß die Dosis des dem Medium zugeführten Pharmakons mehr oder weniger direkt proportional der Konzentration des Pharmakons am Wirkort ist, und somit die beobachteten Effekte direkt den applizierten Dosen zugeordnet werden können. Aber auch bei diesen in vitro durchgeführten Studien ist das entnommene Organ seiner physiologischen Umgebung beraubt, was wiederum Veränderungen der Rezeptoren bewirken könnte. Daher sind in vivo durchgeführte Rezeptorstudien unerläßlich zur Beurteilung der Frage, ob chronische Morphinwirkung Rezeptorveränderungen hervorruft oder nicht.

Werden jedoch unter in vivo Bedingungen erstellte Dosis-Wirkungskurven zur Analyse der Opiat-Rezeptorwirkung nach dem Massenwirkungsgesetz herangezogen, befindet sich zwar der zu untersuchende Rezeptor in seinem intakten physiologischen Milieu, doch treten pharmakokinetische Probleme auf. Denn die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf Dosis-Wirkungskurven setzt voraus, daß die Dosis direkt die Konzentration am Rezeptor wiederspiegelt. Verabreicht man die Substanz aber systemisch, so ist die Wirkkonzentration am Rezeptor nicht nur zeitabhängig sondern auch noch eine Funktion der Resorption. Diese pharmakokinetischen Probleme lassen sich jedoch dadurch ausschalten, daß man die Effekte nicht mit applizierten Dosen sondern mit der Konzentration des Pharmakons am Wirkort zum

Zeitpunkt der Messung korreliert.

Um diese Opiatkonzentrationen messen zu können, bedurfte es einer Methode, mit der man selbst kleinste Mengen an Morphin im Gewebe spezifisch und genau bestimmen kann.

Der erste Teil der Arbeit befaßt sich somit ausschließlich mit der Entwicklung und Optimierung einer solchen empfindlichen Morphin-Bestimmungsmethode.

Im zweiten Teil der Arbeit (siehe spezielle Problemstellung) werden nach dem Massenwirkungsgesetz Dosis-Wirkungskurven analysiert, die unter Zuhilfenahme der zuvor erarbeiteten Meßmethode erstellt wurden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Einführung in Extraktions- und Nachweismethoden für Morphin

Extraktion von Morphin

Die Bestimmung von Morphin und seinen Surrogaten in Körperflüssigkeit oder Geweben verläuft im allgemeinen über zwei Schritte, nämlich die Extraktion der Substanz und deren Nachweis. Das Hauptproblem liegt dabei in der Anreicherung, da diese in der Regel nicht vollständig ist bzw. meistens Substanzen mitextrahiert werden, die den Nachweis stören.

Eine allgemeine Extraktionsmethode von basischen organischen Substanzen aus Gewebe bzw. wässrigen Lösungen beruht auf ihrer Überführung in organische Lösungsmittel. Die mit einer phenolischen OH-Gruppe substituierten Opiate sind in wässrigem stark alkalischen Milieu unter Bildung eines Phenolats löslich, im sauren Milieu unter Bildung eines Ammoniumsalzes. Bei einem pH von 8-10 liegen sie dagegen im ungeladenen Zustand vor und können dann am besten in organische Lösungsmittel überführt werden. Um diesen pH-Bereich einzustellen, wird mit Natriumhydroxid bzw. Ammoniumhydroxid titriert oder ein Überschuß einer Pufferlösung mit pH 9-10 (z.B. eine gesättigte Natriumkarbonatlösung) zugegeben.

Eine direkte Extraktion von Morphin durch Homogenisation des Gewebes in Chloroform/Butanol unter Zusatz eines Hydrogenkarbonatpuffers wurde von Kupferberg et al. (1964) beschrieben. Das dem organischen Lösungsmittel zugesetzte Butanol soll hierbei eine Verringerung der Oberflächenadsorption von Morphin bewirken (Mule, 1964; Wilkenson und Way, 1969; Yeh und Woods, 1970).

Durch eine anfängliche Homogenisation des Gewebes in Trichloressigsäure und die dadurch bedingte Proteinfällung konnte Takemori (1968) die Ausbeute an Morphin bei der nachfolgenden Extraktion mit Chloroform/Butanol wesentlich erhöhen.

Eine wesentliche Verbesserung der Ausbeute gelang durch Silikonisierung der Glasgeräte (Takemori, 1968), durch welche die Adsorption von Morphin ebenfalls verringert wird; dies ist vor allem bei geringen Substanzkonzentrationen im Gewebe entscheidend.

Messung von Morphin

Um sehr niedrige Morphinkonzentrationen messen zu können, wurden verschiedene Wege beschritten, bei denen die Nachweismethode jedoch nicht immer spezifisch genug war. So basierte viele Jahre lang die Bestimmung narkotischer Analgetika auf qualitativen Farbtesten (Clarke, 1959; Ehrlich-Rogozinski, 1963), Mikrokristallographie (Clarke,

1955; Stewart, 1961) und Papierchromatographie (Nakamura, 1960). Diese Methoden waren zeitaufwendig oder nicht sehr empfindlich. Mit photometrischen Methoden (Woods et al., 1954; Fujimoto et al., 1954; Szerb et al., 1957; Siminoff und Saunders, 1958; Way et al., 1960) ließen sich dabei Mikrogrammengen von Morphin bestimmen.

Methoden mit Verwendung radioaktiver Tracer (Adler et al., 1957; Mule und Woods, 1962) erlauben zwar eine Bestimmung im Picogramm-Bereich, sind jedoch nicht sehr spezifisch, da es nicht ohne weiteres möglich ist, die Substanz von Abbauprodukten zu unterscheiden. Durch eine Kombination dieser mit radioaktiven Substanzen arbeitenden Methode mit der Chromatographie läßt sich dieses Problem umgehen (Taylor, 1971).

Kupferberg et al. (1964) entwickelte eine Methode, bei der Morphin als Pseudomorphin fluorimetrisch bestimmt wurde (Nachweisgrenze 0,1 µg). Durch Modifizierung dieser Methode (Takemori, 1968) konnte die Empfindlichkeit dann um das 10fache gesteigert werden.

Eine ebenfalls sehr empfindliche Bestimmungsmethode für Morphin ist der Radioimmunoassay, mit dem eine Messung im Picogramm-Bereich möglich ist. Jedoch läßt sich Morphin mit dieser Methode nicht von Codein - einem Stoffwechsel-

produkt von Morphin - unterscheiden (Spector und Parker, 1970; Spector, 1971). Eine Verbesserung dieser Methode wurde von Gintzler et al. (1976) erreicht, die zusätzlich einen spezifischen Antikörper gegen Codein einsetzten und so den Morphingehalt durch Subtraktion der beiden Meßwerte ermittelten. Die Herstellung von Antiseren mit hoher Spezifität und hoher Avidität ist jedoch oft schwierig und der Erfolg nicht voraussehbar.

Mit Hilfe der Gaschromatographie läßt sich dagegen sowohl eine hohe Trennleistung als auch, bei Verwendung geeigneter Detektoren, eine hohe Sensitivität für Morphin erreichen. Durch Verbindung mit der Massen-Spektroskopie kann die Nachweisgrenze sogar auf 500 pg gesenkt werden (Ebbighausen et al., 1973). Auch mit der Einführung der Elektroneneinfangdetektoren (ECD) s.u. konnte die Empfindlichkeit der gaschromatographischen Bestimmungsmethode gegenüber der Verwendung herkömmlicher Detektoren (Flammenionisationsdetektor, FID; Wärmeleitfähigkeitsdetektor, WLD) vergrößert werden.

Da ein Teil der vorliegenden Arbeit die gaschromatographische und radioimmunologische Bestimmung von Morphin beinhaltet, soll im folgenden das Prinzip dieser Methoden kurz beschrieben werden.

Radioimmunoassay (RIA)

Das Prinzip des RIA besteht darin, daß das zu messende Antigen (Ag) mit einem radioaktiv markierten Derivat (Ag^X), das in einer bestimmten Konzentration vorliegt, um die Bindungsstellen eines in konstanter Konzentration vorliegenden Antikörpers (Ak) konkurriert:

$$Ag + \underset{\text{const.}}{[Ag^X]} + \underset{\text{const.}}{[Ak]} \dashrightarrow \begin{matrix} Ag^X - Ak \\ + \\ Ag - Ak \end{matrix}$$

Dabei wird umso weniger markiertes Antigen gebunden, je größer die Konzentration an unmarkiertem Antigen ist. Nach Einstellung des Gleichgewichtes wird das an den Antikörper gebundene Antigen durch physikalische Trennmethoden vom freien Antigen getrennt. Zur quantitativen Auswertung wird die Radioaktivität des freien (F) oder gebundenen (B) Antigens gemessen und mit einer entsprechenden Eichkurve verglichen.

Die sehr hohe Nachweisempfindlichkeit der Methode beruht darauf, daß

a) Antigene hoher spezifischer Radioaktivität verwendet werden, deren Bestimmung mit großer Genauigkeit und Empfindlichkeit möglich ist;
b) die spezifischen Bindungseigenschaften der Antikörper gegenüber ihren Antigenen ausgenutzt werden.

Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 1000 können

allein nicht als Antigen sondern nur als Hapten wirken, d.h. die Antikörperbildung stimulieren, wenn sie kovalent an ein Trägerprotein (Carrier) gebunden werden. Meistens wird zwischen Carrierprotein und Hapten eine Peptidbindung benötigt. Dazu mußte Morphin zuerst substituiert (als 3-O-Carboxymethylmorphin) und dann an Rinderserumalbumin gebunden werden (Spector und Parker, 1970). Dieses Antigen wird zusammen mit Freund's Adjuvant Tieren wiederholte Male injiziert, um eine Antikörperbildung anzuregen. Das auf diese Weise mit Kaninchen hergestellte Morphinantiserum wurde uns von D.H. Catlin, University of California, Los Angeles, zur Verfügung gestellt.

Gaschromatographie (GC)

Bei der Gaschromatographie wird ein Stoffgemisch beim Passieren einer Säule durch Verteilung zwischen einer gasförmigen und einer stationären Phase getrennt. Diese Trennung ist jedoch im Prinzip nur bei solchen Stoffen möglich, die gasförmig oder leicht verdampfbar sind oder sich durch thermische Zersetzung bzw. durch chemische Reaktion in verdampfbare Stoffe überführen lassen.

Aufgrund der hohen Polarität des Morphins und der dadurch bedingten schlechten Verdampfbarkeit ist es notwendig, flüchtige Derivate herzustellen. Das geschieht entweder in einem vorausgehenden Reaktionsschritt (Brochmann-Hanssen und Svendsen, 1962; 1963; Schmerzler et al.,

1966; Ikekawa et al., 1969; Wilkenson und Way, 1969; Wallace et al., 1972; Sine et al., 1973) oder direkt auf der Säule, indem Morphin zusammen mit dem Derivatbildner in den Gaschromatographen eingespritzt wird (Andes und Mannering, 1962; Mule, 1964; Elliot et al., 1964).

Von den bisher untersuchten stationären Phasen zur Auftrennung verschiedener Morphinderivate erwies sich OV-17 (ein Phenyldimethylpolysiloxan) auf Gas Chrom Q (Diatomeenerden) als inertem Trägermaterial als geeignet (Yeh, 1973).

Nach der Trennung auf der Säule werden die Substanzen im nachgeschalteten Detektor gemessen. Mit dem ECD als empfindlichsten Detektor können Substanzen bestimmt werden, die eine Affinität für freie Elektronen aufweisen, wozu polare, ungesättigte oder halogenierte Verbindungen gehören. In diesem Detektor wird durch freie Elektronen ein konstanter Stromfluß (Nullstrom) erzeugt, der durch Anlagerung der Elektronen an eintretende Substanzen abnimmt. Diese Abnahme ist im linearen Meßbereich der Konzentration der Substanzen direkt proportional.

Das vielfach beim ECD verwendete Spülgas, z.B. Argon/Methan (90%/10%) erhöht das Auflösungsvermögen und vermindert außerdem Störsignale, die bei Ablagerung polarer

Substanzen auf den Elektroden entstehen.

Mit dem ECD gelang es Wallace et al. (1974), noch 25 ng Morphin pro ml Serum in Form des Trifluoracetanhydrid-Derivates zu bestimmen, das nach Yeh (1973) jedoch zu instabilen Verbindungen führen soll.

3.2. Extraktion von Morphin aus Gehirn

Wie bereits vorher kurz erwähnt wurde, kann Morphin im allgemeinen nicht direkt im Gewebehomogenat nachgewiesen werden; dies trifft auch für die Bestimmungen mit dem RIA und der GC zu. Da gute Extraktionsmethoden aus Gehirn zur Messung mit dem RIA schon vorlagen (Shen und Way, 1975a,b,; D.H. Catlin, persönliche Mitteilung) wurden diese Verfahren für die entsprechenden Versuche übernommen (siehe Kap. 3.4.). Dabei wurde Morphin entweder direkt aus dem Gehirn in eine wässrige saure Phase extrahiert oder zuerst in eine organische und anschließend in eine wässrige saure Phase, von der aliquote Teile zur Messung eingesetzt wurden.

Für die GC-Bestimmung von Morphin aus Gehirn lagen entsprechende Erfahrungen dagegen nicht vor. Beschriebene Verfahren gingen von Blut bzw. Urin aus und erwiesen sich - wie auch die Verfahren zur anschließenden Messung mit

dem RIA - als ungeeignet, da zuviele störende Substanzen mit eluiert wurden. Es wurde deshalb durch Kombination beschriebener Verfahren eine Extraktion zur GC-Bestimmung von Morphin aus Gehirn entwickelt.

Im ersten Extraktionsschritt wurde das Gewebe bei $0^{\circ}C$ mit Perchlorsäure homogenisiert (Rattengehirn ~ 2 g/3 ml; Mäusegehirn ~0,4 g/1,5 ml), um Morphin in eine wässrige Phase zu überführen und gleichzeitig Membranen sowie lösliche Proteine auszufällen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und anschließend ein aliquoter Teil des Überstandes mit Karbonatpuffer auf pH 9,0 eingestellt, um Morphin in den ungeladenen Zustand zu überführen. Aus dieser wässrigen Phase ließ sich Morphin mit einer Mischung von Toluol/Butanol (9:1) bei Raumtemperatur extrahieren und dann aus einem aliquoten Teil der organischen Phase in Schwefelsäure (0,1 M) überführen. Nach erneuter Einstellung des pH auf 9,0 durch Zugabe von Karbonatpuffer wurde Morphin in ein Toluol/Butanol-Gemisch (9:1) zurückextrahiert und diese organische Phase anschließend eingedampft. Die wiederholte Phasenverteilung zwischen wässriger und organischer Phase bewirkte eine weitgehende Elimination störender Substanzen.

Bei diesem Extraktionsverfahren betrug die Ausbeute an Morphin etwa 65% bei Konzentrationen <10 ng/g Gehirn und ungefähr 75% bei Konzentrationen >10 ng/g Gehirn (siehe

Kap. 3.3.2.).

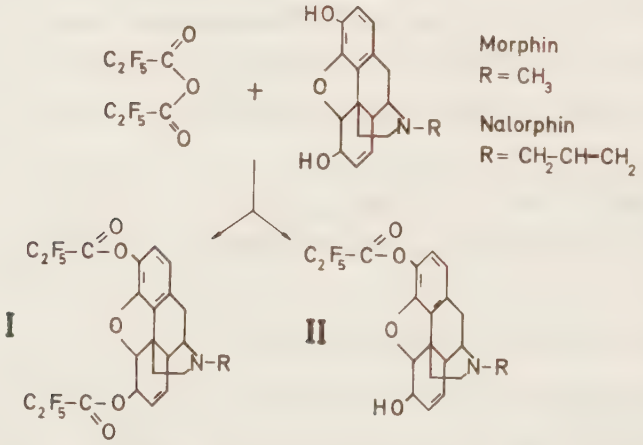
Allerdings mußten bei sehr niedrigen Morphinkonzentrationen von <10 ng/g Gehirn die Extraktionsschritte modifiziert werden: Reduktion des Homogenisationsvolumens (bei Rattengehirn 2 g/1,5 ml; bei Mäusegehirn 0,4/0,75 ml) und Wiederholung der Reextraktion von der organischen Phase in die schwefelsaure Phase zur Verringerung von Störfaktoren (Einzelheiten siehe experimenteller Teil).

3.3. Gaschromatographische Bestimmung von Morphin

3.3.1. Derivatisierung von Morphin

Da das polare Morphin nicht direkt gaschromatographisch gemessen werden kann (siehe Kap. 3.1.), mußte es nach der Extraktion in geeigneter Weise derivatisiert werden. Das Derivat sollte stabil sein und außerdem eine hohe Affinität zu Elektronen aufweisen, um einen möglichst empfindlichen Nachweis im Elektroneneinfangdetektor (ECD) zu ermöglichen. Dazu wäre eine Derivatisierung mit Trifluoracetanhydrid geeignet, die nach Yeh (1973) jedoch zu instabilen Produkten führt. Deshalb wurden Versuche mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFP) als Derivatbildner durchgeführt. Aufgrund des höheren Halogenanteils sollten darüberhinaus diese Morphinderivate zur Messung mit dem ECD noch geeigneter sein als die mit Trifluoracetanhydrid.

Zur Derivatisierung wurde Morphin bzw. der bei 70°C unter Stickstoff eingedampfte Gewebeextrakt in Äthylacetat aufgenommen. Nach Zugabe von PFP wurde die Reaktion 30 Minuten lang bei 60°C durchgeführt, wobei folgende Umsetzung stattfindet:



Dabei werden sowohl die OH-Gruppen von Morphin als auch von Nalorphin verestert, das zu Anfang der Extraktion dem Gewebe bzw. vor der Derivatisierung als interner Standard zugegeben worden war (siehe Kap. 3.3.2.).

Nach Beendigung der Reaktion wurde der überschüssige Derivatbildner PFP zusammen mit Äthylacetat bei 20°C unter Stickstoff abgedampft, der Rückstand in Äthylacetat aufgenommen und aliquote Teile davon in den Gaschromatographen eingespritzt.

Beide Reaktionsprodukte - gebildet wird vor allen Dingen Reaktionsprodukt I - konnten massenspektroskopisch nach ihrer gaschromatographischen Trennung identifiziert werden. Derivat (II) erscheint dabei im Gaschromatogramm als Schulter des Peaks von Derivat (I) (siehe Kap. 3.3.3.).

Um Reaktionsprodukt (I) möglichst quantitativ zu erhalten, wurden die Reaktionsbedingungen variiert. Es zeigte sich aber, daß weder eine Temperaturerhöhung auf 70°C noch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 60 Minuten die Bildung von (II) vollständig verhindern kann. Oberhalb 70°C verfärbte sich der Reaktionsansatz und der gaschromatographische Nachweis der Derivate wurde durch einen erhöhten Background erschwert.

Durch sorgfältige Trocknung des Äthylacetats (Destillation und Aufbewahrung über Calciumhydrid), wodurch eine partielle Hydrolyse von Produkt (I) vermieden werden sollte, konnte die Bildung von Produkt (II) ebenfalls nicht verhindert werden.

Bei einer vollständigen Bildung von Reaktionsprodukt (I) wäre eine quantitative Auswertung der Analyse mit dem Integrator einfacher (siehe Kap. 3.3.2.). Da jedoch auch Nalorphin (interner Standard) die entsprechenden Produkte in einem ähnlichen Verhältnis bildet, ist eine nennenswerte Verfälschung der Analysenergebnisse aufgrund der

unvollständigen Derivatisierung unwahrscheinlich.

Die gebildeten Derivate konnten ohne Beeinträchtigung der Analysenergebnisse bei 4°C bis zu 3 Tagen in Mikrogefäßen aufbewahrt werden, während bei Raumtemperatur der Anteil an Produkt (II) immer größer wurde.

3.3.2. Messung und Auswertung

Um methodische Schwankungen bei der Extraktion, der Derivatisierung und beim gaschromatographischen Nachweis herauszumitteln, mußte der Meßwert von Morphin (siehe unten) auf den Wert eines internen Standards bezogen werden. Im vorliegenden Fall wurde Nalorphin verwendet (Street, 1967), das sich von Morphin nur durch eine Allylgruppe anstelle einer Methylgruppe unterscheidet und sich daher bei der Extraktion, der Derivatisierung und bei der gaschromatographischen Trennung ähnlich wie Morphin verhält. Nalorphin wurde deswegen bei der Morphinbestimmung im Gehirn schon zu Anfang der Extraktion zu jeder Probe in konstanter Konzentration hinzugegeben und bei der Ermittlung der externen Standardkurven (siehe unten) mit Morphin zusammen derivatisiert.

Bei der gaschromatographischen Trennung erwies sich eine Temperatur von 215°C bei einer Durchflußgeschwindigkeit

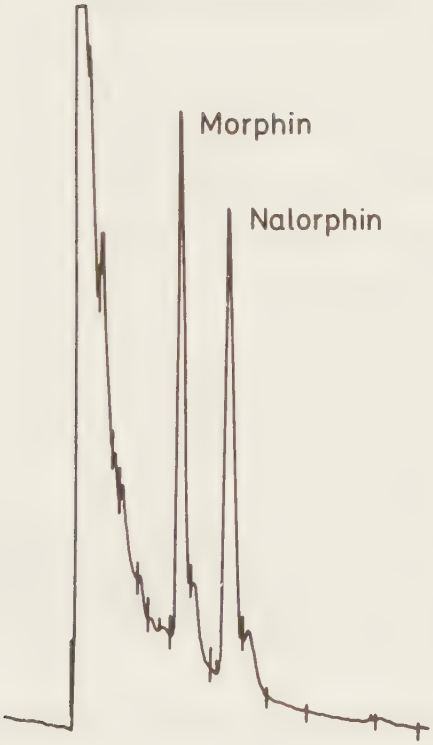


Abb. 2: Chromatogramm von PFP-Morphin und PFP-Nalorphin.
Retentionszeiten für PFP-Morphin 252 Sek., für PFP-Nalorphin 357 Sek.; Ofentemperatur 210°C, Einspritzblock 245°C, Detektor 230°C; Gasdurchfluß Helium 25 ml/Min., Argon/Methan 25 ml/Min.; Säule: Glas, 6 Fuß x 2 mm, 3% OV-17 auf Gas Chrom Q.

des Trägergases Helium von 25 ml/Min. und des Spülgases Argon/Methan von 25 ml/Min. bei der eingesetzten Säule (siehe experimenteller Teil) als optimal. Dieses 1:1 Verhältnis der Durchflußgeschwindigkeiten von Trägergas und Spülgas war für die Registrierung von Substanzpeaks im Detektor wichtig, da eine Veränderung eine Herabsetzung der Meßempfindlichkeit bewirkte. Unter oben genannten Bedingungen wurden als Retentionszeiten für Morphin 252 Sekunden und für Nalorphin 357 Sekunden gemessen. Wie Abb. 2 zeigt, werden für beide Substanzen steile und schmale Peaks registriert, die quantitativ voneinander getrennt werden. Dabei war die Länge der Säule (6 Fuß x 2 mm) wichtig, da mit einer halb so langen Säule die Trennung von Morphin und Nalorphin nicht so gut gelang.

Die erhaltene Peakform ist für die Integratorauswertung - bei der die Fläche als Maß der Substanzmenge automatisch gemessen wird - besonders geeignet.

Die quantitative Bestimmung einer Substanz läßt sich besonders gut im linearen Bereich durchführen, da hier die Meßwerte der Substanzmenge direkt proportional sind. Um diesen Bereich zu ermitteln, wurden steigende Mengen der Morphinderivate gaschromatographisch gemessen. Wie Abb. 3 zeigt, liegt dabei die untere Nachweisgrenze bei 10 pg, die obere etwa bei 120 ng. Dieser dynamische Meßbereich (0,01 ng - 120 ng) schließt den linearen mit ein, der von

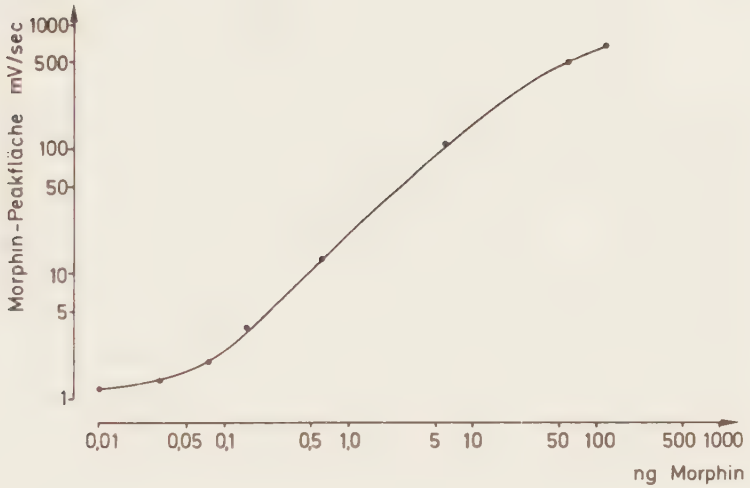


Abb. 3: Bestimmung des linearen Bereichs für den Morphinnachweis.
Ordinate: Morphin-Peakfläche (mV/Sek.);
Abszisse: eingespritzte Morphinmenge (ng);
Derivatisierung und Messung von Morphin ohne vorherige Extraktion.

etwa 75 pg bis zu 10 ng reicht. Für Nalorphin wurden entsprechende Bereiche ermittelt.

Die Auswertung der Morphinanalysen wurde in der Weise durchgeführt, daß die Fläche der Morphinpeaks auf die des internen Standards Nalorphin bezogen wurde. Der gebildete Quotient wurde dann mit den Werten einer der entsprechenden Standardkurven in Abb. 4 verglichen.

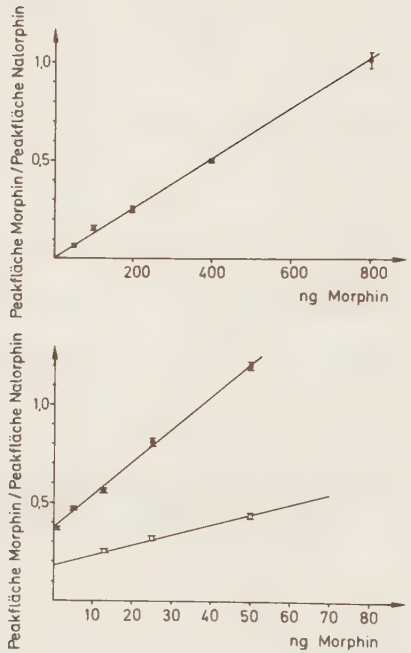


Abb. 4: Interne Standardkurven für Morphin. Ordinate: Peakfläche Morphin (mv/Sek.)/Peakfläche Nalorphin (mV/Sek.); Abszisse: eingespritzte Morphinmenge (ng). Steigende Mengen von Morphin werden zusammen mit konstanten Mengen an Nalorphin (interner Standard) zum Gehirn gegeben und nach Extraktion und Derivatisierung gaschromatographisch gemessen. (●=800 ng, o=200 ng, ◘=80 ng Nalorphin). Die einzelnen Punkte geben die Mittelwerte von jeweils drei Messungen wieder. Standardabweichung der Steigung von mehreren Kurven ± 5%, Standardabweichung der einzelnen Meßwerte <10ng/g Gehirn ± 15%, >10ng/g Gehirn ± 4%.

Zur Ermittlung dieser Standardkurven wurden steigende Mengen von Morphin und konstante Mengen Nalorphin

(80,200 und 800 ng) zu Gehirnen hinzugegeben, die von unbehandelten Tieren stammten. Anschließend wurden Homogenisation, Extraktion, Derivatisierung und Messung wie beschrieben durchgeführt.

Da die Arbeit die Messung möglichst niedriger Morphinkonzentrationen im Gehirn erforderte, sollten durch die Aufstellung dieser verschiedenen Standardkurven günstige Meßvoraussetzungen für unterschiedliche Morphinkonzentrationen geschaffen werden. Außer den oben gezeigten Standardkurven, die sich auf Versuche mit Ratten beziehen, wurden auch Standardkurven für Versuche mit Mäusen ermittelt, die einen vergleichbaren Kurvenverlauf aufweisen und daher nicht gesondert abgebildet werden. Die Standardabweichung der Steigung von mehreren Kurven beträgt etwa $\pm$ 5%, die der einzelnen Meßwerte im Bereich von 1-10 ng Morphin/g Gehirn etwa $\pm$ 15% und im Bereich von 10-800 ng Morphin/g Gehirn ungefähr $\pm$ 4%. Zur Errechnung der Ausbeute der Morphinextraktion wurde folgendermaßen verfahren: definierte Mengen an Morphin wurden zum Gehirn gegeben, nach der Extraktion mit 600 pg Nalorphin versetzt und derivatisiert. Die anschließend erhaltenen Meßwerte wurden mit der externen Standardkurve verglichen, zu deren Erstellung Morphin und Nalorphin ohne vorhergehende Extraktion derivatisiert und gemessen wurden (Abb. 5). Die Standardabweichung der Steigung der einzelnen externen Standardkurven betrug dabei $\pm$ 4% und die der einzelnen Meßwerte $\pm$ 3%.

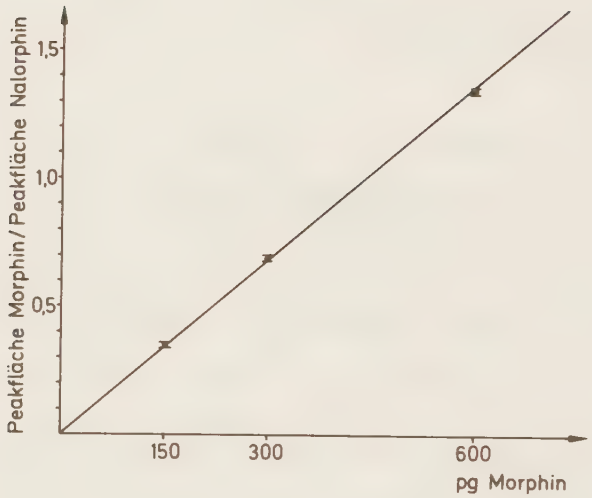


Abb. 5: Externe Standardkurve für Morphin. Ordinate: Peakfläche Morphin (mV/Sek.) Peakfläche Nalorphin (mV/Sek.); Abszisse: eingespritzte Morphinmenge (pg). Steigende Mengen von Morphin werden zusammen mit einer konstanten Menge von Nalorphin (600 pg) derivatisiert und gaschromatographisch gemessen. Die einzelnen Punkte geben die Mittelwerte von jeweils drei Messungen wieder; Standardabweichung der Steigung der einzelnen Kurven $\pm$ 4%, Standardabweichung der einzelnen Meßwerte $\pm$ 3%.

Mit diesem Vergleich konnte für die Morphinextraktion aus dem Gehirn bei einer Morphinkonzentration von 1-10 ng/g Gehirn eine Ausbeute von 65% ermittelt werden, bei Konzentrationen >10 ng/g Gehirn wurden 75% errechnet.

Zur Bestimmung der untersten Nachweisgrenze für Morphin

nach Extraktion und Derivatisierung wurde der Meßwert gewählt, der signifikant über dem Background lag, d.h. bei dem das Signal mindestens doppelt so groß wie das Rauschsignal war. Da das Rauschsignal konstant bei einem Meßwert lag, der einer Morphinkonzentration von etwa 0,4 ng/g Gehirn (bei Ratten) und ungefähr 1,1 ng/g Gehirn (bei Mäusen) entsprach, konnte Morphin unter diesen Bedingungen noch in einer Konzentration von etwa 1 ng/g Rattengehirn und etwa 3 ng/g Mäusegehirn gemessen werden.

3.3.3. Störfaktoren

Bei der Messung geringer Morphinmengen ~ 1 ng/g Gehirn (Ratten) bzw. 3 ng/g Gehirn (Mäuse) (siehe Kap. 3.3.2.) - im Bereich der unteren Nachweisgrenze - können selbst sehr kleine Störfaktoren zu falschen Ergebnissen führen. Es wurde daher geprüft, ob die Morphinmetaboliten Normorphin und das in vivo in geringer Menge entstehende Codein (Elison und Elliot, 1964) möglicherweise ähnliche Retentionszeiten aufweisen wie Morphin. Da Normorphin jedoch im Chromatogramm erst nach dem Nalorphin auftrat, beeinträchtigte dieser Metabolit die Analyse nicht. Unter den für Morphin und Nalorphin optimalen gaschromatographischen Bedingungen (Temperatur, Gasdurchfluß siehe Kap. 3.3.2.) war es jedoch nicht möglich, eine vollständige Auftrennung des Nalorphin- und des Codein-Peaks zu

erhalten. Doppelanalysen von in vivo Experimenten ohne den internen Standard Nalorphin zeigten aber, daß die entstehende Codeinmenge bei den geringen bestimmten Morphinkonzentrationen viel zu klein war, um die Analyse beeinflussen zu können.

Eine weitere Störung durch Naloxon, das in einigen Versuchen den Tieren neben Morphin verabreicht wurde, konnte ausgeschlossen werden, da die durch die Derivatisierung resultierenden zwei Peaks des Naloxons im Vergleich zum Morphin- und zum Nalorphin-Peak mit einer sehr viel kleineren Retentionszeit registriert werden. Eine quantitative Auswertung der beiden Naloxon-Peaks ist jedoch nach vorangegangener Gehirnextraktion nicht möglich, da durch mitextrahierte flüchtigere Substanzen der Lösungsmittelpeak verbreitert wird und sie dadurch überdeckt.

Eine zum Teil auftretende Schulterbildung des Morphin- und Nalorphin-Peaks (siehe Kap. 3.3.1., Abb. 2) erwies sich als störend für die Quantifizierung, da sie durch Veränderungen in der Gasdurchflußgeschwindigkeit und der Temperatur nicht abgetrennt werden konnte. Da sie innerhalb mehrerer Chromatogramme unterschiedlich stark auftrat, wurde sie vom Integrator manchmal als Bestandteil des Hauptpeaks registriert, oder als eigener Peak gewertet. Beide Schultern traten jedoch immer gemeinsam bei Morphin und Nalorphin auf; Berechnungen der Peakflächen beider Schultern ergaben

außerdem das Verhältnis 1:1. Die Vermutung, daß die Schulterbildung auf unvollständiger Derivatisierung beruht, konnte durch massenspektroskopische Untersuchungen (Dr. Lerche, Pharmazeutisches Institut, Universität München) bestätigt werden, da die beiden Peaks Substanzen entsprachen, die sich im Molekulargewicht genau um eine CF_3-CF_2-CO-Gruppe unterschieden. Worauf diese unvollständige Derivatisierung beruhte, konnte nicht ermittelt werden.

Abschließend sei noch angeführt, das anfänglich auftretendes Grundrauschen im Chromatogramm, bedingt durch störende Verunreinigungen, die aus den organischen Extraktionsmitteln sowie aus Äthylacetat stammten, durch fraktionierte Destillation dieser Lösungsmittel eliminiert werden konnte. Durch Reinigung der bei Homogenisation, Extraktion und Derivatisierung verwendeten Glasgeräte in kochender Salpetersäure und anschließender Silikonisierung konnten die Analysenergebnisse dann nochmals verbessert werden. Mit diesen Maßnahmen wurde außerdem die Analysendauer wesentlich verkürzt, da die Basislinie schon etwa 8 Minuten nach Analysenbeginn (Einspritzen in den GC) wieder erreicht war.

3.4. Radioimmunoassay für Morphin

3.4.1. Messung und Auswertung

Nach Erarbeitung einer empfindlichen gaschromatographischen Bestimmungsmethode für Morphin wurde der Morphinnachweis mit dem Radioimmunoassay (RIA) untersucht, um beide Methoden miteinander vergleichen zu können. Der dafür benötigte Antikörper wurde von D.H. Catlin, University of California, Los Angeles, zur Verfügung gestellt.

Die der radioimmunologischen Messung vorausgehende Extraktion aus dem Gehirn wurde nach zwei Verfahren durchgeführt (siehe Kap. 3.2.):

a) einer Extraktion mit organischen Lösungsmitteln entsprechend der Methode von Shen und Way (1975a,b), die sie von Kupferberg et al. (1964) übernommen hatten,
b) einer Extraktion mit Säure.

Aufgrund einer unterschiedlichen Beeinflussung der RIA-Analyse durch diese beiden Extraktionsmethoden werden die damit erzielten Ergebnisse getrennt behandelt. Die zuerst beschriebenen Versuche beziehen sich auf Experimente, bei denen die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln vorgenommen wurde.

Beim RIA sollte das markierte Antigen (in diesem Fall ^{3}H-Morphin) in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen etwa zu

20-40% vom Antikörper gebunden werden, damit eine kompetitive Verdrängung zwischen dem ^{3}H-Morphin und dem zu bestimmenden unmarkierten Antigen optimal gemessen werden kann (Felber, 1974). Zur Ermittlung geeigneter Antikörperkonzentrationen (Titer) wurden deshalb unterschiedliche Mengen mit einer konstanten Menge an ^{3}H-Morphin inkubiert; diese war so gewählt, daß sie einerseits der Größenordnung der geringsten zu messenden Morphinkonzentrationen entsprach und andererseits die spezifische Bindung im Vergleich zur unspezifischen Bindung groß genug war (s.u.). Da außerdem zu erwarten war, daß die Gehirnextrakte die spezifische Bindung zwischen Morphin und Antikörper beeinflussen, wurden die Inkubationen in Gegenwart derselben aliquoten Teile dieser Extrakte durchgeführt, die bei späteren Messungen zur Bestimmung der Morphinkonzentrationen im Gehirn eingesetzt wurden. Ein einzelner Inkubationsansatz enthielt dabei neben 400 µl der verdünnten Antikörperlösungen noch 100 µl des Gehirnextraktes sowie 50 µl (2,27 pMol) einer 1:1000 verdünnten ^{3}H-Morphin-Stammlösung (spezifische Aktivität 22 Ci/mMol).

Titer	1 : 100	1 : 150	1 : 200
% Bdg. von ^{3}H-Morphin	25%	14%	8,9%

Tab. 1: % der Bindung des eingesetzten ^{3}H-Morphin bei unterschiedlichen Antikörperverdünnungen. Ein Inkubationsansatz enthielt: 400 µl Gehirnextrakt und 50 µl ^{3}H-Morphin (2,27 pMol).

Tab. 1 zeigt, daß dabei der 1:100 verdünnte Antikörper (Titer) die erwünschte Menge von 25% des ^{3}H-Morphins bindet. Dieses Verhältnis von ^{3}H-Morphin zu Antikörper wurde deshalb für spätere Messungen konstant gehalten, zu deren Auswertung folgende Werte herangezogen werden:

B: spezifisch gebundenes markiertes Antigen in Gegenwart von unmarkiertem Antigen

B_o: spezifisch gebundenes markiertes Antigen in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen

UB: unspezifisch gebundenes markiertes Antigen, Ersatz des Morphin-Antiserums durch verdünntes Serum von unbehandelten Tieren.

Unter den oben angegebenen Bedingungen wurde bei 25% Bindung des ^{3}H-Morphins für B_o etwa eine Radioaktivität von 10.000 cpm und für UB ungefähr 300 cpm gemessen.

Bei den nachfolgenden Versuchen wurde die Verdrängung des markierten Morphins durch steigende Mengen an unmarkiertem Morphin gemessen. Die auf diese Weise erhaltene Standardkurve (siehe Abb. 6a,b) besaß im Meßbereich von etwa 3 -140 pMol/ml (dem entspricht etwa 0,850 ng - 40 ng/ml) an unmarkiertem Morphin eine Standardabweichung von ungefähr $\pm$ 5%. Kleinere Morphinkonzentrationen als 2,5 pMol/ml ließen sich in Gegenwart von Gehirnextrakten wegen zu großer Schwankungsbreite der Meßwerte nicht mehr genau messen.

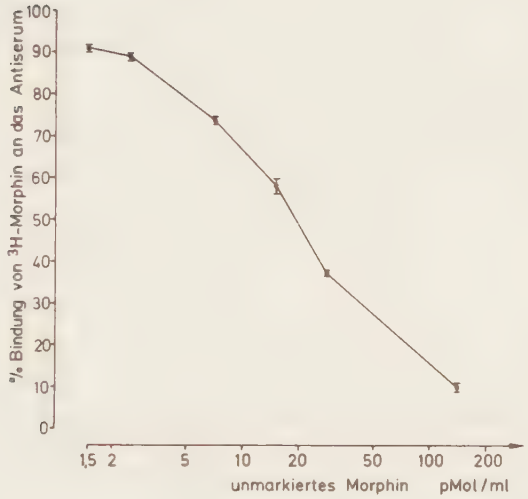


Abb. 6a: Externe Standardkurve für Morphin unter Beeinflussung des organischen Extraktionsmittels. Ordinate: % Bindung von ^{3}H-Morphin an das Antiserum; Abszisse: steigende Mengen an unmarkiertem Morphin (pMol/ml). Steigende Mengen an unmarkiertem Morphin werden zu Inkubationsansätzen gegeben, die Antiserum, eine konstante Menge an ^{3}H-Morphin (2,27 pMol) und Gehirnextrakte unbehandelter Tiere enthielten; die Extraktion wurde mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Die einzelnen Meßpunkte geben die Mittelwerte von jeweils 3 Messungen wieder; Standardabweichung der einzelnen Werte $\pm$ 5%.

Um unbekannte Morphinmengen in Gehirnextrakten bestimmen zu können, mußte beim Vergleich ihrer Meßwerte mit der Standardkurve noch die Ausbeute der Extraktion berücksichtigt werden. Zu dieser Berechnung wurden steigende Mengen Morphin (10 ng/g-500 ng/g Gehirn, dem entspricht etwa

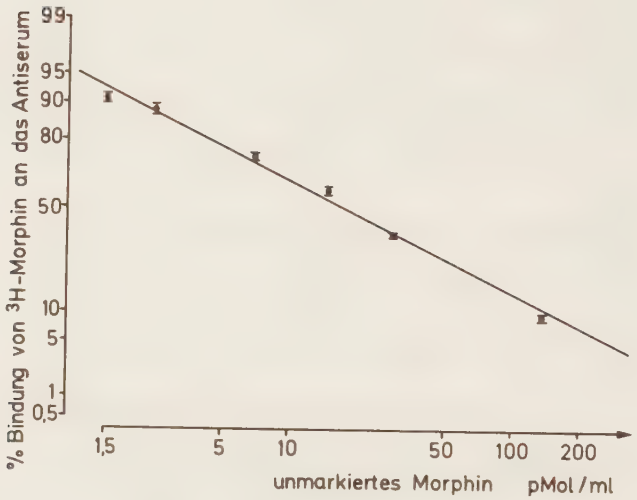


Abb. 6b: Logit-log Transformation von Abb. 6a
Die hier angewandte Auftragungsweise nach einer logit-log Transformation hat den Vorteil, daß die B/B_o-Werte von 0,1-0,9 linearisiert werden.

350 pMol-17,5 nMol/g) zum Gehirn gegeben und nach erfolgter Extraktion mit dem RIA gemessen. Ein Vergleich dieser Meßwerte mit denen der Standardkurve in Abb. 6a,b ergab bei Konzentrationen < 35 ng/g Gehirn eine Ausbeute von 60% und bei Konzentrationen >35 ng/g Gehirn eine Ausbeute von 85%. Die niedrigste Morphinkonzentration, die sich auf diese Weise noch messen ließ, lag bei etwa 10 ng/g Gehirn; die Standardabweichung der Meßwerte nach der Gehirnextraktion betrug im Bereich von 10-35 ng/g Gehirn $\pm$ 25% und von 35-500 ng/g Gehirn etwa $\pm$ 10%.

Als nächstes werden die Ergebnisse angeführt, die mit der RIA-Analyse nach vorangegangener Extraktion mit Säure erhalten worden waren.

Auch hier mußte erst die günstige Antikörperverdünnung ermittelt werden. Wie Tab. 2 zeigt, war nach diesem Verfahren schon ein Titer von 1:200 ausreichend, um 32,1% des markierten Morphins zu binden.

Titer	1 : 100	1 : 150	1 : 200
% Bdg. von ^{3}H-Morphin	78,9%	67,7%	32,1%

Tab. 2: % der Bindung des eingesetzten ^{3}H-Morphin bei unterschiedlichen Antikörperverdünnungen. Ein Inkubationsansatz enthielt: 400 µl des Antikörpers mit angegebenem Titer, 100 µl Gehirnextrakt und 50 µl ^{3}H-Morphin (2,27 pMol).

Alle weiteren Bestimmungen nach der Extraktion mit Säure wurden daher mit dieser Verdünnung des Antikörpers durchgeführt.

Die ermittelten externen Standardkurven (Durchführung siehe Legende von Abb. 6) besaßen im Meßbereich von ungefähr 1,5-140 pMol/ml (dem entspricht etwa 430 pg-40 ng/ml) eine Standardabweichung von etwa $\pm$ 4% (siehe Abb. 7).

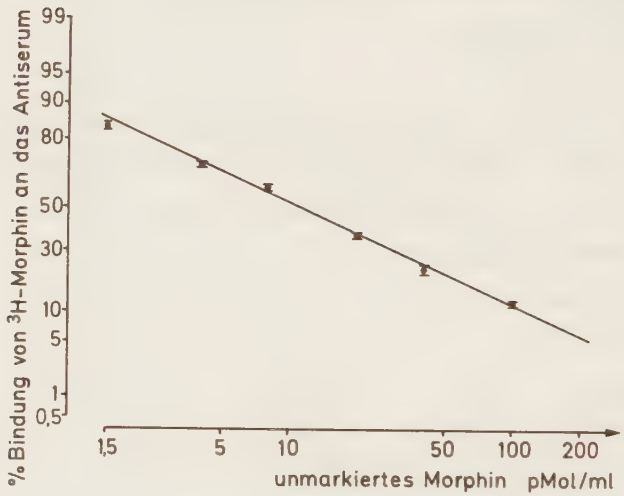


Abb. 7: Externe Standardkurve für Morphin unter Beeinflussung des Extraktionsmittels (Säure). Ordinate: % Bindung von ^{3}H-Morphin an das Antiserum; Abszisse: steigende Mengen an unmarkiertem Morphin (pMol/ml). Ermittlung der Standardkurve siehe Legende von Abb. 6; statt des organischen Lösungsmittels ist hier Säure als Extraktionsmittel verwendet worden. Standardabweichung der einzelnen Meßwerte $\pm$ 4%.

Mit diesem Säure-Extraktionsverfahren ließ sich außerdem die Nachweisempfindlichkeit und die Ausbeute etwas erhöhen; so lag die niedrigste Morphinkonzentration, die nach der Gehirnextraktion noch zu messen war, bei 8 ng/g Gehirn bei einer Ausbeute von 73%, bei Konzentrationen >20 ng/g Gehirn erhöhte sie sich auf 92%. Die Standardabweichung eines einzelnen Meßwertes betrug dabei im Bereich von 8-20 ng/g

Gehirn ungefähr ± 15% und von 20-500 ng/g Gehirn ± 4%. Damit erwies sich die Säure-Extraktion von Morphin im Vergleich zur Extraktion mit organischen Lösungsmitteln als etwas günstiger.

3.4.2. Spezifität des Antiserums

Das im Verlaufe dieser Arbeit verwendete Antiserum wurde auf seine Spezifität hin untersucht, um eventuelle Kreuzreaktionen verschiedener Opiate mit dem Antikörper in Gegenwart von markiertem Morphin zu ermitteln. Dazu wurden dem Standardansatz, der konstante Mengen an Antikörper und ^{3}H-Morphin enthielt, verschiedene Mengen der Opiate zugesetzt (siehe experimenteller Teil) . In Abb. 8 ist der Einfluß verschiedener Opiate auf die ^{3}H-Morphin-Antikörper Bindung dargestellt.

Es ist zu erkennen, daß Codein vom Antikörper besser gebunden wird als Morphin, da zu einer 50% Inhibierung der Bindung von ^{3}H-Morphin an den Antikörper schon eine Codeinkonzentration von 2,1 pMol/ml ausreicht, im Gegensatz zu einer Morphinkonzentration von 5,4 pMol/ml. Diese bessere Bindung von Codein an den Antikörper läßt sich damit erklären, daß zur Antikörperbildung (Immunisierung) das Hapten 3-O-Carboxymethylmorphin verwendet wurde, das mit der Methoxy-Gruppe in C_3 mehr Ähnlichkeit mit Codein als mit Morphin aufweist.

Substanz	Kodein	Morphin	Morphin-3-glucuronid	Normorphin	Naloxon
IC_{50} (pMol/ml)	2,1	5,4	333	1060	10000

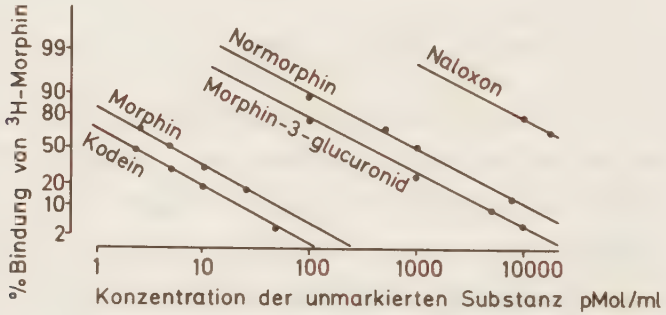


Abb. 8: Bestimmung der Spezifität des Morphin-Antiserums. Morphinabkömmlinge mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen und ihr Einfluß auf die Bindung zwischen ^{3}H-Morphin und Antikörper, dargestellt in Form der IC_{50}-Werte (= die Konzentration an unmarkierter Substanz (pMol/ml), die den Antigen^x-Antikörper-Komplex um 50% erniedrigt). Ordinate: % Ausgangsbindung von ^{3}H-Morphin an den Antikörper; Abszisse: Konzentration der unmarkierten Substanz (pMol/ml).

Die beiden Hauptmetaboliten von Morphin, Normorphin und Morphin-3-glucuronid, werden dagegen vom Antiserum so wenig gebunden, daß sie die Messung von Morphin nicht stören.

Als weiterer möglicher Störfaktor kam der Morphinantagonist Naloxon in Frage, da er bei den mit dem RIA gemessenen Tierversuchen in hohen Dosen appliziert worden war. Doch auch

diese Substanz liegt weit außerhalb des Störbereiches, da mehr als 10^4 pMol/ml nötig waren, um 50% der ^{3}H-Morphin-Antikörper Bindung zu hemmen.

3.5. Vergleich der gaschromatographischen Bestimmungsmethode mit dem Radioimmunoassay

Sowohl die Gaschromatographie (GC) als auch der Radioimmunoassay (RIA) sind empfindliche Bestimmungsmethoden für Morphin, da mit beiden noch im unteren Nanogramm-Bereich gemessen werden kann (siehe Kap. 3.3.2. und Kap. 3.4.1.). Dennoch unterscheiden sie sich in einigen Kriterien, die in Tab. 3 zusammengestellt sind, beträchtlich.

Damit Morphin mit der GC gemessen werden kann, muß es zuvor derivatisiert werden (siehe Kap. 3.3.1.). Als geeignet für den Nachweis im ECD erwies sich dabei die Umsetzung mit PFP, die zu stabilen Derivaten führte. Ein vergleichbarer Aufbereitungsschritt ist bei der Messung mit dem RIA dagegen nicht nötig.

Bei beiden Methoden muß Morphin vor der Messung aus Gewebe extrahiert und von störenden Substanzen abgetrennt werden, die beim RIA entweder selbst an den Antikörper binden oder aber das Morphin wegfangen können, während sie bei der GC zu einer Erhöhung des Untergrunds beitragen oder im

M E T H O D E N V E R G L E I C H

	GC	RIA
Ausbeute der Extraktion	im Bereich von: <10 ng/g Gehirn 65% >10 ng/g Gehirn 75%	im Bereich von: <20 ng/g Gehirn 73%) a) >20 ng/g Gehirn 92%) <35 ng/g Gehirn 60%) b) >35 ng/g Gehirn 85%)
Meßvolumen	<10 µl	100 µl
Dynamischer Meßbereich	0.010 ng-120 ng	0.145 ng-30 ng
Unterste Nachweisgrenze nach Extraktion	3 ng/g Gehirn[1] 1 ng/g Gehirn[2]	8 ng/g Gehirn a) 10ng/g Gehirn b)
Standardabweichung nach Extraktion	im Bereich von: 10-800 ng/g ± 4% 1- 10 ng/g ±15%	im Bereich von: 20-500 ng/g ± 4%) a) 8- 20 ng/g ±15%) 35-500 ng/g ±10%) b) 10- 35 ng/g ±25%

Tab. 3: Methodenvergleich zwischen GC und RIA
Die einzelnen Werte wurden aus den vorangegangenen Kapiteln tabellarisch zusammengestellt.
a) Extraktion mit Säure; b) Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. [1] Mäuse (0,4 g Gehirn), [2] Ratten (2 g Gehirn) (Unterschiede aufgrund verschiedener Relationen von Gehirn zu Extraktionsvolumen.

Chromatogramm als Peaks erscheinen können, die mit dem des Morphins bzw. des internen Standards Nalorphin überlappen. Für die beiden Methoden waren verschiedene Extraktionen nötig, die sich in ihrer Ausbeute unterscheiden. Da beim RIA weniger Extraktionsschritte erforderlich waren (siehe

Kap. 3.2.), um störende Substanzen in genügendem Maße abzutrennen, liegt hier die Ausbeute an Morphin bei der besser geeigneten Säure-Extraktion mit 92% bei Konzentrationen >20 ng/g Gehirn (bzw. 75% bei < 20 ng/g) beträchtlich über der Extraktionsmethode für die GC mit 75% bei Konzentrationen >10 ng/g Gehirn (bzw. ~ 65% bei <10 ng/g).

Als weitere Limitierung kommt bei der GC hinzu, daß bei einer für die Trennung geeigneten Säule nur 1-10 µl pro Messung eingesetzt werden können, beim RIA dagegen 100 µl. Da jedoch der dynamische Meßbereich - die Menge an Morphin, die bei einer Analyse gemessen werden kann - bei der GC von 10 pg-120 ng bei dem RIA dagegen nur von 145 pg-30 ng reicht, liegt die Nachweisgrenze für Morphin nach der Extraktion aus dem Gehirn bei der GC mit ~ 1 ng/g bei Ratten und ~ 3 ng/g bei Mäusen dennoch tiefer im Vergleich zur Messung mit dem RIA, wo je nach Extraktionsmethode 8 bzw. 10 ng/g bei Mäusen noch erfaßt werden.

Neben der Empfindlichkeit und Genauigkeit einer Meßmethode spielt die Spezifität der Analyse eine wichtige Rolle, vor allem wenn störende Substanzen in einem vorhergehenden Trennungsgang nicht vollständig abgetrennt werden können. Bei der Bestimmung von Morphin müssen daher Stoffwechselprodukte (z.B. Codein) bzw. Naloxon, das bei bestimmten Fragestellungen mit Morphin zusammen appliziert wurde (siehe Kap. 3.6.4.), in Betracht gezogen werden. Von

diesen Substanzen störte Codein bei beiden Methoden, wenn auch in unterschiedlicher Weise. Bei der GC überlappte der Codein-Peak mit dem des internen Standards Nalorphin (siehe Kap. 3.3.3.), so daß geringere Morphinkonzentrationen vorgetäuscht werden könnten. Beim RIA wurde Codein dagegen vom Antikörper besser gebunden als Morphin (siehe Kap. 3.4.2.), so daß in diesem Falle eine Verschiebung zu höheren Werten zu erwarten wäre. Die mit der GC gemessenen Codeinmengen waren jedoch zu gering, um die Meßwerte von Morphin in beiden Fällen zu beeinflussen. Dies zeigten auch Parallelversuche, bei denen bei toleranten Tieren mit beiden Methoden vergleichbare Morphinkonzentrationen im Gehirn gemessen wurden (siehe Kap. 3.6.4.).

Naloxon dagegen störte bei beiden Methoden nicht (siehe Kap. 3.3.3. und 3.4.2.), so daß Morphin in Gegenwart von Naloxon mit beiden Methoden bestimmt werden konnte. Dies war ein Teilprojekt der Arbeit (siehe Kap. 3.6.4.)., in dem der Einfluß von Naloxon auf den Morphinspiegel im Gehirn naiver und toleranter Tiere gemessen werden sollte.

Bei den weiteren Teilprojekten wurde die Morphinkonzentration im Gehirn ausschließlich mit der GC gemessen, die etwas empfindlicher und genauer ist.

Abschließend sei noch aufgeführt, daß nach Erarbeitung der GC-Methode ähnliche Daten wie in der vorliegenden Arbeit

von Dahlström et al. (1975) publiziert wurden. In diesen Versuchen war als Derivatbildner ebenfalls PFP verwendet worden; die Nachweisgrenze lag dabei vergleichbar bei ~2 ng/g Gehirn. In einer im letzten Jahr veröffentlichten Arbeit von Nicolau et al. (1977) war die Derivatisierung von Morphin mit Heptafluorbutyrylanhydrid (HFB) beschrieben worden, mit der Morphin noch empfindlicher gemessen werden konnte (unterste Grenze des dynamischen Bereichs ~ 2 pg; Nachweisgrenze 0,1 µg/Liter Urin). Bei der Verwendung des ECD als Detektor scheint damit die untere noch mögliche Nachweisgrenze erreicht zu sein.

Bei dem RIA könnte die Nachweisgrenze durch Verwendung eines affineren Antikörpers wahrscheinlich ebenfalls gesenkt werden. Sollten dabei ähnlich niedrige Meßbereiche erreicht werden, wäre diese Methode vor allem für Versuchsserien geeigneter, da Extraktion (in diesem Fall die Säure-Extraktion) und Messung weniger aufwendig und zeitraubend sind.

3.6 Anwendung der Bestimmungsmethoden auf bestimmte biologische Fragestellungen

3.6.1. Spezielle Problemstellung

Wie bereits in der allgemeinen Problemstellung angeführt wurde (siehe Kapitel 2), sollte untersucht werden, ob sich bei chronischer Morphinverabreichung qualitative und/oder quantitative Veränderungen an den Opiatrezeptoren abspielen, die das Toleranz/Abhängigkeitsgeschehen erklären könnten. Bisher wurde diese Frage durch zwei unterschiedliche Verfahrensweisen untersucht, die sehr widersprüchliche Ergebnisse lieferten.

So zeigte die Mehrzahl aller Bindungsstudien, die in vitro an Hirnhomogenaten durchgeführt wurden, daß sich offensichtlich die Rezeptoren im Zustand der Toleranz/Abhängigkeit nicht verändern (siehe Höllt und Wüster, 1978). Einzelne Beobachtungen über Veränderungen ließen sich nicht mit dem Grad von Toleranz und Abhängigkeit korrelieren.

Den Ergebnissen dieser in vitro durchgeführten Rezeptorstudien stehen dagegen eine Reihe von Befunden gegenüber, die mit in vivo Methoden erhoben wurden. Sie besagen, daß sich die Qualität der Rezeptorinteraktion mit Antagonisten verändert, wenn Tiere sich im Zustand der Toleranz und Abhängigkeit befinden. Ein Teil dieser Studien bediente sich der sogenannten pA_2-Methode, mit deren Hilfe sich die Wirksamkeit von Antagonisten in Gegenwart des Agonisten bestimmen läßt (Schild, 1949; Takemori et al., 1973; Tulunay und Takemori, 1974a,b). Dazu werden Dosis-Wirkungskurven des Agonisten alleine und in Gegenwart steigender Dosen des Antagonisten mit Hilfe einer speziellen auf dem Massenwirkungsgesetz beruhenden graphischen Darstellung analysiert.

Alle diese mit Hilfe dieser Methode durchgeführten Untersuchungen besagten, daß sich die Affinität der Rezeptoren zum Opiatantagonisten Naloxon anscheinend erhöht, wenn Morphin über längere Zeit appliziert wird (Takemori et al., 1973; Davis et al., 1975; Shen und Way, 1975a,b; Smith et al., 1976; Kitano und Takemori, 1978; Wong und Bentley, 1978).

Diese vorwiegend mit Hilfe der pA_2-Methode erstellten in vivo Befunde schienen durch aufsehenerregende, jedoch fragwürde Befunde von Shen und Way (1975a,b) gestützt zu werden, die besagten, daß anscheinend Naloxon bei tolerant/abhängigen Mäusen in der Lage ist, die Gehirnkonzentration von Morphin signifikant zu reduzieren, während an naiven Tieren seine solche Reduktion im Morphin-Gehirnspiegel nach Naloxon nicht zu beobachten ist. Auch dieser Befund wurde von den Autoren im Sinne einer Affinitätszunahme für Naloxon interpretiert.

Zur Unterstützung dieser in vivo erhobenen Ergebnisse wurde die allgemein bekannte Beobachtung herangezogen, daß bei zunehmender Abhängigkeit immer weniger Naloxon nötig ist, um einen Entzug auszulösen. Es erhebt sich daher die Frage, warum solche qualitativen Rezeptorveränderungen unter in vitro Bedingungen nicht zu beobachten sind. Eine mögliche Erklärung wäre, daß solche Veränderungen bei der Durchführung der Probengewinnung verlorengehen. Sehr viel

wahrscheinlicher ist jedoch die Annahme, daß die in vivo beobachteten Veränderungen methodische Artefakte darstellen und nicht auf wirklich vorhandenen Rezeptorveränderungen beruhen. Eine genaue Betrachtung der von den Autoren angewandten pA_2- und in vivo Verdrängungsmethode ergab eine Reihe von möglichen Fehlerquellen (Dum et al., 1978). Es war daher das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, unter Anwendung einer neuen in vivo Methode bei Ausschaltung aller möglichen Fehlerquellen die Frage einer möglichen Opiatrezeptorveränderung erneut zu prüfen.

Anmerkungen zu in vivo Messungen

A. mit Agonisten

Sollte sich tatsächlich, wie die oben aufgeführten in vivo Befunde vermuten lassen, der Morphinrezeptor in seinen Bindungseigenschaften für Antagonisten ändern, so müßte dies auch für Agonisten zutreffen, da diese ja nach der vorherrschenden Meinung einer kompetitiven Interaktion zwischen Agonisten und Antagonisten an den gleichen Bindungsstellen wie die Antagonisten angreifen.

In vivo Untersuchungen über die Wechselwirkung von Agonisten und Rezeptoren liegen aber bisher nicht vor und stellen den Hauptteil dieser Arbeit dar. Dabei sollte die Art der Gestaltsänderung von Dosiswirkungskurven für Morphin bei

steigender Toleranzentwicklung nach dem Massenwirkungsgesetz analysiert werden.

Ausschaltung von Fehlerquellen:

Damit in vivo gemessene Beziehungen zwischen Dosis und Wirkungen tatsächlich die Beziehung zwischen Rezeptorbesetzung und dadurch ausgelösten Reizantworten wiederspiegeln, oder in anderen Worten ausgedrückt, damit die Wirkungen des Ganztieres tatsächlich als eine Funktion der Rezeptorbesetzung angesehen werden können, müssen eine Reihe von Voraussetzungen erfüllt sein:

1) die Wirkungen, die gemessen werden, müssen kontinuierlich abgestuft, gut meßbar und gut reproduzierbar sein. Das heißt, die häufig zu ED_{50}-Messungen herangezogenen sogenannten "quantalen Methoden" (siehe Kalant et al., 1971) sind für solche Untersuchungen nicht geeignet, da sie auf "alles oder nichts" Antworten beruhen und somit keine wirklich abgestuften Effekte messen. Die Dosen werden bei dieser Methode mit einem statistischen Parameter korreliert, und zwar mit der Häufigkeit, mit der ein Tierkollektiv diese "alles oder nichts" Effekte zeigt. Die Maxima von solchen sigmoidalen Summenhäufigkeitskurven stellen willkürliche Maxima dar, da die Dosen, bei denen sie erreicht werden, von der Stärke des willkürlich zugrunde gelegten Effektes abhängen. Daraus folgt, daß das Zusammenfallen von maximalem (100%) Effekt und maximaler Rezeptorbesetzung rein

zufälliger Natur ist. Die meisten der in der Literatur vorliegenden Dosis-Wirkungskurven für Morphin sind mit solchen quantalen Methoden gewonnen und deshalb für Rezeptor-Interaktionsstudien nicht geeignet. Die Dosis-Wirkungskurven der vorliegenden Studie wurden deshalb mit Hilfe der sogenannten Analog-Methode erstellt, bei der die einzelnen Dosen mit klar abgestuften, gut reproduzierbaren variablen Effekten korreliert werden.

2) bei in vivo durchgeführten Drogen-Rezeptor-Interaktionsstudien müssen pharmakokinetische Einflüsse soweit wie möglich eliminiert werden, da entsprechend dem Massenwirkungsgesetz nicht die Menge der applizierten Substanz sondern die Konzentration der applizierten Substanz in direkter Rezeptorumgebung für die Höhe der Wirkung entscheidend ist. Diese Konzentration direkt im Rezeptorkompartiment ist jedoch eine Funktion der Zeit und Resorbierbarkeit der jeweiligen Substanz und somit nicht unbedingt proportional der verabreichten Dosis. In allen oben angeführten in vivo Studien wurde dieser Punkt jedoch nicht beachtet, weswegen diese Studien auch großer Kritik ausgesetzt waren. In der hier vorliegenden Arbeit wurden deshalb pharmakokinetische Einflüsse dadurch ausgeschaltet, daß die gemessenen Effekte mit Hirnkonzentrationen des applizierten Morphins korreliert wurden. Zur Messung dieser Gehirnspiegel wurde die im ersten Teil der Arbeit beschriebene Gaschromatographie eingesetzt.

3) Sollen Dosis-Wirkungskurven von toleranten Tieren erstellt werden, so muß in Betracht gezogen werden, daß bei den tolerant/abhängigen Tieren zum Zeitpunkt der Testdosisverabreichung ein gewisses Quantum von "chronischem" Morphin - bedingt durch die chronische Prämedikation - bereits im Körper vorhanden ist. Somit sind die Wirkungen, die beobachtet werden, nicht genau proportional der akuten Hirnkonzentration, die aus der Testdosis resultiert, sondern proportional der Summe der akuten und chronischen Morphinkonzentration. Auch dies wurde in allen oben angeführten in vivo Studien nicht streng bedacht und stellte so möglicherweise eine Fehlerquelle dar, die in der vorliegenden Studie ausgeschaltet wurde.

B. mit Antagonisten

Zur Unterstützung der Versuche von Teil A sollte in einem zweiten Teil untersucht werden, in welcher Art sich Dosis-Wirkungskurven für ein typisches von Antagonisten provoziertes Entzugsphänomen mit Zunahme von Abhängigkeit/Toleranz verändern. Diesem Versuch liegt die Tatsache zugrunde, daß Naloxon ein kompetitiver Antagonist ist und somit an den gleichen Rezeptoren wie das Morphin angreift. Veränderungen in der Qualität der spezifischen Opiatrezeptoren sollten also in ähnlicher Weise die Bindung von Agonisten und Antagonisten verändern. Mit anderen Worten,

Dosis-Wirkungskurven für Naloxon induzierte Entzugsphänomene sollten sich mit zunehmender Toleranz/Abhängigkeit in qualitativ ähnlicher Weise verändern wie die Kurven von Agonisten, sofern die Veränderungen tatsächlich auf Unterschiede in Bindungseigenschaften der Rezeptoren und nicht auf methodischen Ursachen beruhen. Die Versuche sollten unter möglichst ähnlichen Bedingungen wie die Versuche mit Agonisten durchgeführt werden, das heißt an identisch vorbehandelten Ratten. Bisher gibt es keinerlei Studien ähnlicher Art und die in der Literatur vorhandenen Dosis-Wirkungskurven für Naloxon induzierte Entzugsphänomene wurden fast immer mit der quantalen Methode erstellt, die, wie oben ausführlich diskutiert, keine brauchbaren Ergebnisse liefert, wenn es darum geht, Fragen der zugrundeliegenden Drogen-Rezeptor-Interaktion zu beantworten.

Zur Verdrängung von Agonisten durch Antagonisten

Ein dritter Teil der biologischen Untersuchungen sollte in enger inhaltlicher Anlehnung zu vorhergehenden Versuchen den Befund von Shen und Way (1975a,b) überprüfen, der besagt, daß die Morphinkonzentration im Gehirn toleranter Tiere nach Naloxoninjektion stark abfällt, bei naiven Tieren dagegen von der Antagonistengabe nicht beeinflußt wird. Dieser Effekt wurde mit einer Affinitätszunahme der Rezeptoren gegenüber Naloxon erklärt. Dieser Befund, zumindest jedoch seine Interpretation, ist schwer nachvollziehbar. Da Morphin ein Agonist mit geringer Affinität zum Morphin-

rezeptor ist, ist nur ein minimaler Teil der gemessenen Hirnkonzentration an die in geringer Zahl vorhandenen spezifischen Opiatrezeptoren gebunden; der weitaus überwiegende Teil dagegen liegt in unspezifisch gebundener Form vor. Geht man davon aus, daß Antagonisten lediglich um spezifische, nicht jedoch um unspezifische Rezeptoren mit dem Agonisten konkurrieren, und daß die somit durch Naloxon verdrängbare Morphinmenge winzig klein ist im Verhältnis zur Gesamthirnkonzentration, so kann die nach Naloxon beobachtete Senkung in der Morphinkonzentration kaum durch Verdrängung des Morphins von seinen spezifischen Rezeptoren verursacht worden sein. Da dieser Befund aber die Diskussion um etwaige Rezeptorveränderungen während der Toleranzentwicklung stark zugunsten solcher Veränderungen beeinflußt hat, sollte versucht werden, diese Messungen mit Hilfe des von den Autoren verwandten Radioimmunoassays zu reproduzieren. Um auszuschließen, daß das mit herkömmlichen Vorstellungen nicht zu erklärende Ergebnis nicht auf methodischen Besonderheiten des Radioimmunoassay beruht, sollten in Parallelversuchen die Morphinkonzentrationen außerdem mittels einer zweiten der gaschromatographischen Methode bestimmt werden.

3.6.2. Charakterisierung des Toleranzmechanismus an Hand einer auf dem Massenwirkungsgesetz beruhenden Analyse von Konzentrations-Wirkungskurven für Morphin-induzierte Analgesie.

3.6.2.1. Veränderungen in der Gestalt von Dosis-Wirkungskurven bei Zunahme der Toleranz.

Wie in der speziellen Problemstellung dargelegt wurde, sollten bei zunehmender Toleranzentwicklung eine Reihe von Dosis-Wirkungskurven für Morphin-induzierte Analgesie aufgestellt werden, um deren Formveränderungen dann mit Hilfe der aus dem Massenwirkungsgesetz herleitbaren Gesetzmäßigkeiten zu analysieren.

Um abgestufte Wirkungen messen zu können, wurde die Methode von Hoffmeister (1968) verwandt. Bei dieser Methode werden den Tieren steigende Schmerzreize durch elektrische Reizung der Schwanzwurzel zugefügt. Auf diesen Schmerzreiz reagieren die Tiere mit Vokalisation. Die Höhe des Stromes, die bei den Tieren Vokalisation auslöst, dient dabei als Schmerzschwelle. Es wurde nun ermittelt, wie sich der Einfluß des Morphins auf diese Schmerzschwelle bei chronischer Morphinverabreichung verändert. Dazu wurden Dosis-Wirkungskurven in naiven Tieren mit Dosis-Wirkungskurven in Tieren verglichen, die unterschiedliche Grade von Toleranz/Abhängigkeit entwickelt haben.

Die Toleranz wurde in den Ratten durch Implantation von Morphin-Depot-Tabletten unter die Rückenhaut erzeugt (siehe experimenteller Teil, Kap. 5.3.1.). Dabei wurde die Anzahl der implantierten Tabletten pro Implantation, das Zeitintervall zwischen den Implantationen und die Länge der Implantationsperiode variiert (siehe Bläsig et al., 1973; Theiss et al., 1974). Zum Zeitpunkt des Versuchs wiesen die mit sehr unterschiedlichen Morphinmengen derart vorbehandelten Tieren weder deutliche Zeichen akuter Morphinwirkung auf, noch waren Anzeichen spontanen Entzugs erkennbar. Die Tiere waren somit weitgehend an das in ihrem Körper befindliche Morphin adaptiert und befanden sich im Zustand eines funktionellen Gleichgewichts (Homoöstase, siehe Einleitung), unabhängig davon, ob sie 1 Tablette vier Tage zuvor (sog. 1/4 Gruppe) oder 24 Tabletten innerhalb von 10 Tagen (sog. 24/10 Gruppe) implantiert bekommen hatten.

Um sicher zu sein, daß durch die Steigerung der Depot-Tablettenimplantation tatsächlich eine Erhöhung der Morphinkonzentration im Gehirn erreicht wurde, wurde bei diesen Tieren die zum Zeitpunkt des Versuchs im Gehirn vorhandene Morphinmenge gaschromatographisch bestimmt.

Wie Tabelle 4 zeigt, unterscheiden sich die einzelnen Gruppen signifikant durch die Höhe der Morphinkonzentration im Gehirn. Dabei bestand eine Korrelation zwischen

Kode	1/4	6/10	13/10	24/10
Morphin-Gehirn-konzentra-tionen ng/g	108 ± 27	267 ± 38	780 ± 46	1142 ± 276

Tab. 4: Morphinkonzentrationen im Gehirn verschieden toleranter Ratten. Die Kodes geben verschiedene Muster der Toleranzinduzierung wieder, wobei die erste Zahl die Anzahl der implantierten Morphin-Depottabletten wiedergibt, die zweite Zahl den Zeitraum (Tage) der Tablettenimplantation. Die Morphinkonzentrationen (ng/g) wurden mit der GC gemessen. Jeder Wert repräsentiert den Durchschnittswert von Messungen aus mindestens 6 Gehirnen.

der Konzentration und der Anzahl der implantierten Morphin-Depottabletten. Die Konzentration bewegte sich zwischen einem Wert von 108 ng Morphin/g Gehirn bei der Gruppe, die nur eine Depottablette bekommen hatte und 1142 ng Morphin/g Gehirn bei der mit 24 Depottabletten implantierten Gruppe.

Bei diesen unterschiedlich toleranten Tieren wurde nun die analgetische Wirkung von akut applizierten Morphin (s.c. Injektion steigender Morphindosen),wie beschrieben, bestimmt, wobei der Effekt zunächst einmal auf die applizierte Morphindosis und nicht auf die tatsächliche Hirnkonzentration bezogen wurde. Abb. 9 zeigt, daß vor Applikation der Testdosis alle Versuchsgruppen eine ähnliche

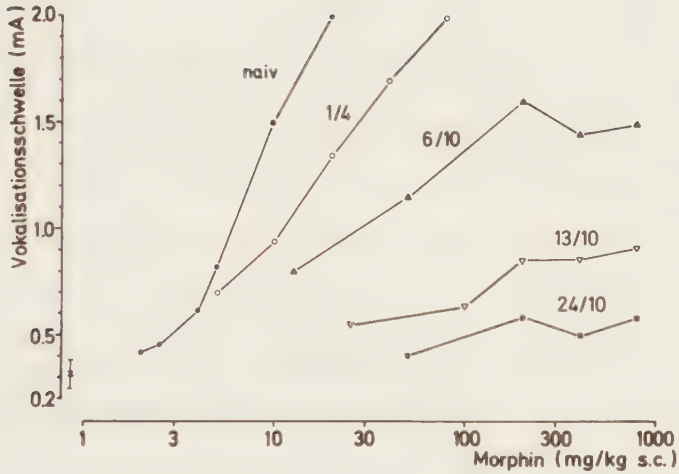


Abb. 9: Dosis-Wirkungskurven für Morphin induzierte Analgesie an unterschiedlich toleranten Ratten. Die Analgesie wurde 45 Minuten nach der s.c. Injektion von Morphin gemessen. Die erste Zahl der Indizes der Kurven gibt die Anzahl der implantierten Morphin-Depot-Tabletten an, die zweite Zahl bedeutet den Zeitraum der Implantation in Tagen. Der einzelne Punkt in der linken Ecke gibt die durchschnittliche Schmerzschwelle von naiven und toleranten Tieren vor der Morphingabe an (5 Ratten von jeder Gruppe). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert von Messungen an mindestens 12 Ratten. Abszisse: Morphindosis in mg/kg s.c.; Ordinate: Vokalisationsschwelle in mA.

Vokalisationsschwelle haben (Meßpunkt in der linken Ecke). Mit steigender Zahl der implantierten Morphintabletten werden immer höhere Dosen von Morphin zur Auslösung einer analgetischen Wirkung erforderlich. Das zeigt sich darin, daß die Kurven systematisch nach rechts in den Bereich höherer Dosen verschoben werden. Interessanterweise sind die Dosis-Wirkungskurven jedoch nicht parallel nach rechts verschoben, sondern werden allmählich immer flacher. Während bei naiven und schwach toleranten Tieren (1/4 Gruppe) die Vokalisation durch hohe Morphindosen selbst bei der maximal applizierten Stromstärke von 2 mA noch unterdrückt wird, ist dies bei hoch toleranten Tieren (6/10, 13/10, 24/10 Gruppe) selbst bei applizierten Morphindosen von 1000 mg/kg nicht mehr möglich. Es tritt daher schon bei niedrigen Stromstärken ein Plateau der Morphinwirkung auf. Das heißt, die analgetische Wirkung erreicht ein Maximum, das auch durch weitere Vergrößerung der Dosen nicht erhöht werden kann. Bei der Gruppe mit dem höchsten Toleranzgrad (24/10 Gruppe) ist kaum mehr eine signifikante analgetische Wirkung des akut applizierten Morphins nachzuweisen. Bei genauer Betrachtung sieht man, daß die Maxima, wenn vorhanden, immer im gleichen Dosenbereich auftreten (etwa 200 mg/kg). Bei naiven und wenig toleranten Tieren sind die Kurven so steil, daß die Maxima außerhalb des limitierten Meßbereichs liegen. Die Kurven enden im aufsteigenden Schenkel und der obere sigmoidale Teil der Kurve läßt sich mit der hier verwendeten Methode

nicht darstellen. Dazu wären Schmerzreize nötig, die weit über 2 mA hinausgehen, was unzumutbar für die Tiere wäre.

3.6.2.2. Ausschluß pharmakokinetischer Ursachen für die beobachteten Gestaltsveränderungen der Dosis-Wirkungskurven.

Das Ergebnis einer mehr oder weniger totalen Toleranzentwicklung gegenüber Morphin war recht unerwartet, da bisher aus der Literatur keinerlei ähnliche Befunde bekannt sind. Es war daher notwendig zu prüfen, ob es sich hier tatsächlich um einen totalen Verlust der pharmakologischen Wirksamkeit des Morphins oder vielleicht um eine Resorptionsstörung des Morphins bei zunehmender Toleranzentwicklung handelte. Dazu wurde untersucht, ob die Resorption des Morphins sich in toleranten Tieren verändert. Dies wurde so durchgeführt, daß steigende, akut applizierte, ungefähr equianalgetische Morphindosen in naiven und toleranten Tieren mit den zum Zeitpunkt des Maximaleffektes auftretenden Hirnkonzentrationen von Morphin korreliert wurden. Das heißt, naiven Tieren wurden Dosen zwischen 1 und 15 mg Morphin/kg Körpergewicht und toleranten Tieren Dosen von 30-800 mg Morphin/kg gespritzt. Es zeigte sich, daß die Hirnkonzentrationen, die in naiven Tieren erreicht wurden, eine Gerade bildeten mit den Konzentrationen, die durch höhere Dosen in den toleranten Tieren erreicht wurden (siehe Abb. 10).

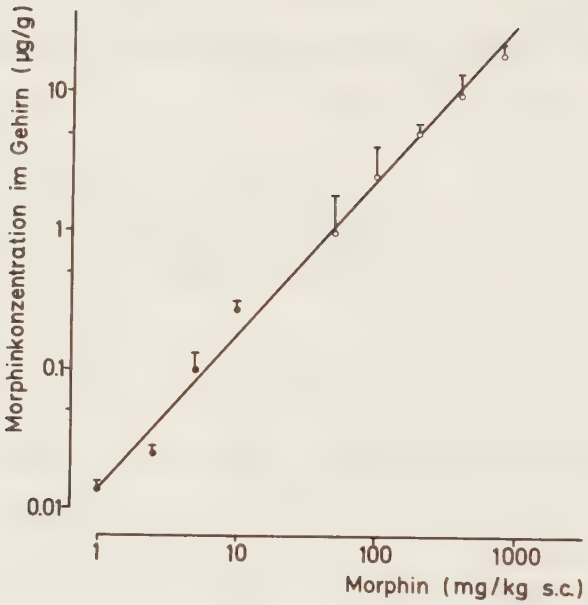


Abb. 10: Beziehung zwischen subkutan applizierten Morphindosen und Morphinkonzentrationen im Gehirn von Ratten. Die Ratten erhielten 60 Minuten vor dem Töten steigende Dosen von Morphin (Abszisse: Morphindosis mg/kg s.c.) injiziert. Die Morphinkonzentrationen im Gehirn (Ordinate: µg/g) wurden wie beschrieben mit der GC gemessen. Die schwarzen Punkte beziehen sich auf Morphindosen, die naiven Tieren appliziert wurden, die Kreise auf Dosen, die sogenannten "6/10" Ratten verabreicht worden waren; diese 6/10 Tiere hatten vorher 6 Morphin-Depot-Tabletten innerhalb 10 Tagen erhalten (siehe Methoden). Die in den Gehirnen von toleranten Tieren vorhandenen chronischen Morphinmengen (siehe Tab. 4) wurden von jeder Gehirnkonzentration subtrahiert, die nach Applikation der akuten Dosis in den toleranten Tieren gemessen wurde. Jeder Punkt gibt den Durchschnittswert von Messungen an 6 Gehirnen mit den Standardabweichungen wieder.

Aufgrund dieses eindeutigen Ergebnisses konnte die Hypothese einer Resorptionsverminderung des Morphins in toleranten Tieren verworfen werden. Die Ursache für das Abflachen der Dosis-Wirkungskurven war somit also nicht von pharmakokinetischer Natur, sondern lag offensichtlich in einem allmählich stattfindenden totalen Wirksamkeitsverlust des Morphins.

Dieser Schluß wurde noch dadurch gestützt, daß eine ähnliche Abflachung der Dosis-Wirkungskurven auch dann zu beobachten war, wenn in den gleichen Morphin-abhängigen Tieren das Opiat nicht systemisch sondern direkt in das Hirnventrikelsystem verabreicht wurde (siehe Abb. 11). Diese intraventrikulären Versuche wurden mit dem hochaffinen Opiat Etorphin durchgeführt, da Morphin aufgrund seiner relativ geringen Affinität zum Rezeptor viel stärkere unspezifische Nebenwirkungen besitzt (die ja nicht wie die spezifischen Wirkungen der Toleranz unterliegen) und somit zu toxisch ist, wenn es in den zur Überwindung der Toleranz erforderlichen hohen Dosen direkt ins Gehirn gespritzt wird.

Wie die Abbildung 11 zeigt, ist auch in den hochmorphintoleranten Tieren mit dieser direkten Art der Opiatapplikation kaum mehr eine schmerzstillende Wirkung auszulösen.

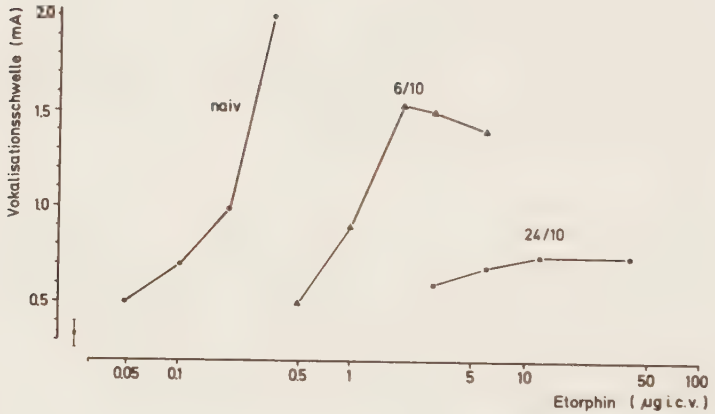


Abb. 11: Dosis-Wirkungskurven für Etorphin-induzierte Analgesie in Ratten mit unterschiedlichem Toleranzgrad. Etorphin wurde intraventrikulär appliziert (Abszisse: µg); die Vokalisationsschwelle (Ordinate: mA) wurde 20 Minuten nach der Etorphingabe (Zeitpunkt des Maximaleffektes) gemessen. Die erste Zahl der Indizes der Kurven gibt die Anzahl der implantierten Morphin-Depot-Tabletten an, die zweite Zahl bedeutet den Zeitraum der Implantation in Tagen. Der Punkt in der linken Ecke gibt den Durchschnittswert der Vokalisationsschwelle von toleranten und naiven Tieren vor Etorphingabe an. Jeder Punkt der Kurve repräsentiert den Durchschnittswert von Messungen an mindestens 6 Ratten.

3.6.2.3. Analyse der den Dosis-Wirkungskurven zugrundliegenden Veränderungen.

Einleitende Bemerkungen

Die Tatsache, daß die Kurven mit Zunahme der Toleranz nicht parallel verschoben wurden, sondern sich allmählich abflachten, ließ keinen Zweifel daran, daß Toleranzentwicklung sich nicht ausschließlich durch eine Affinitätsverminderung des Morphins zu seinem Rezeptor erklären ließe. Eine solche auf qualitativen Veränderungen des Opiatrezeptors beruhende Affinitätsverminderung des Morphins würde nämlich gemäß dem Massenwirkungsgesetz dazu führen, daß die Kurven zwar auch wie im vorliegenden Fall laufend nach rechts verschoben würden, jedoch ohne ständig dabei einen Teil des Maximaleffektes einzubüßen. Damit Veränderungen in der Form von Dosis-Wirkungskurven wie im vorliegenden Fall auftreten, müßte man das alleinige Vorhandensein eines nicht kompetitiven Mechanismus fordern oder aber das Vorhandensein eines aus sowohl kompetitiven (Rezeptorveränderung) wie auch nicht kompetitiven Veränderungen kombiniertem Mechanismus.

Beschreibung des zur Analyse herangezogenen graphischen Verfahrens

Um der Frage nachzugehen, ob also die Toleranzentwicklung durch kompetitive oder nicht kompetitive nervöse Mechanismen

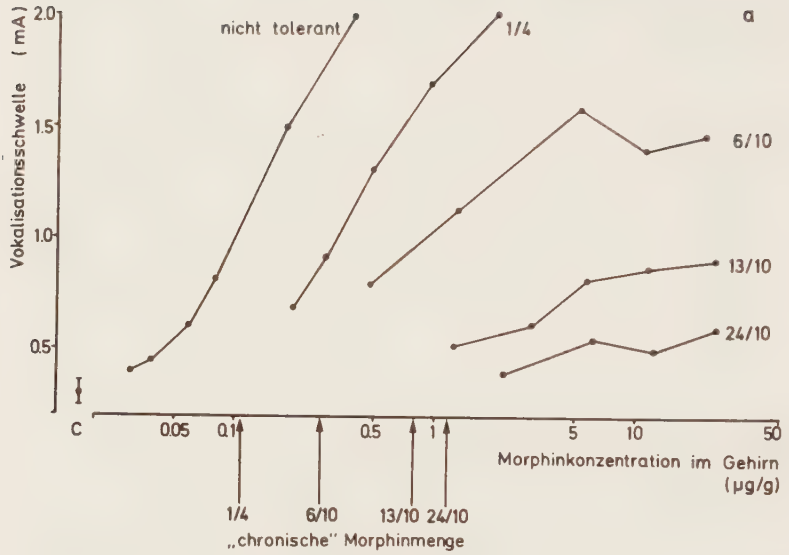
zustandekommt, wurden die vorhandenen Daten einer auf dem Massenwirkungsgesetz beruhenden Analyse unterworfen. Dabei wurde der sogenannte Lineweaver/Burk plot angewandt, der speziell für diese Fragestellung Aussagekraft besitzt. Bei dieser graphischen Darstellung werden die gemessenen Effekte mit den reziproken Dosen korreliert. Dabei erhält man Geraden, die die x- und y-Achse schneiden. Der Schnittpunkt auf der y-Achse gibt den Maximaleffekt an, der Schnittpunkt auf der x-Achse den Wendepunkt der symmetrischen sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven. Der Wendepunkt der Kurven ist gemäß einer Herleitung aus dem einfachen Massenwirkungsgesetz gleich der Dissoziationskonstanten und der reziproke Wert der Dissoziationskonstanten wiederum entspricht laut dem Massenwirkungsgesetz der Affinität der Substanz zum Rezeptor. Es ist mit Hilfe dieses Plots also möglich, den genauen Wert der Affinität graphisch zu ermitteln.

Umwandlung der Dosis-Wirkungskurven in Konzentrations-Wirkungskurven und Darstellung der Daten im Lineweaver-Burk plot.

Diese auf dem Massenwirkungsgesetz beruhende graphische Auswertung ist nur dann zur Analyse von am Ganztier gewonnenen Daten zu verwenden, wenn die Dosen tatsächlich den Konzentrationen des Pharmakons am Wirkort entsprechen (siehe allgemeine Problemstellung). Dies ist jedoch bei

den in Abb. 9 dargestellten Kurven nicht der Fall. Hier wurden die akut applizierten Dosen, nicht jedoch die wirklich im Körper befindliche Menge Morphin mit den Wirkungen korreliert. Wie Tab. 4 besagt, besitzen die Tiere zum Zeitpunkt der Testdosisverabreichung alle eine bestimmte Menge Morphin, welches aus den in unterschiedlichen Mengen vorher verabreichten Depottabletten stammt. Diese Menge Morphin muß zu den akut applizierten Dosen also jeweils hinzuaddiert werden. Dazu wurden die in Abb. 9 dargestellten Dosis-Wirkungskurven in Konzentrations-Wirkungskurven umgewandelt. Die Konzentration, die durch die akut applizierte Dosis erreicht wird, wurde der Eichkurve (siehe Abb. 10) entnommen. Zu diesem Wert wurde bei jeder Gruppe die entsprechende bereits vorher im Tier vorhandene Konzentration an "chronischem Morphin" dazuaddiert. Auf diese Weise erhält man die wahren Konzentrations-Wirkungskurven, die auf den ersten Blick den in Abb. 9 dargstellten Dosis-Wirkungskurven sehr ähneln (siehe Abb. 12). Bei näherem Hinsehen entdeckt man jedoch, daß sich insbesondere der untere Teil der in den schwächer abhängigen Tieren erstellten Kurven aufrichtet, also eine entscheidende Formveränderung erfährt.

Wenn diese Daten nun graphisch nach Lineweaver und Burk umgewandelt werden, so erhält man Geraden, die alle die x-Achse in einem Punkt schneiden. Nach obigen Ausführungen stellt der Schnittpunkt auf der x-Achse den negativen


a
Vokalisationsschwelle (mA)
2.0
1.5
1.0
0.5
nicht tolerant
1/4
6/10
13/10
24/10
C
0.05
0.1
0.5
1
5
10
50
Morphinkonzentration im Gehirn (µg/g)
1/4
6/10
13/10
24/10
„chronische" Morphinmenge

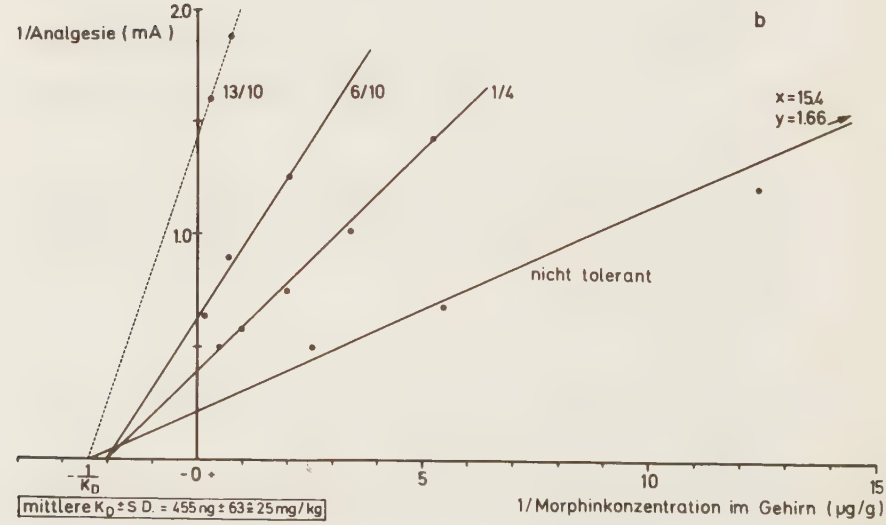

b
1/Analgesie (mA)
2.0
1.0
13/10
6/10
1/4
x=15.4
y=1.66
nicht tolerant
-1/K_D
-0
5
10
15
mittlere K_D ± S.D. = 455 ng ± 63 ≙ 25 mg/kg
1/Morphinkonzentration im Gehirn (µg/g)

Abb. 12 oberer Teil: Umwandlung von Dosis-Wirkungskurven für Morphin-induzierte Analgesie (siehe Abb. 9) in Gehirnkonzentrations-Wirkungskurven. Die Konzentrationen von Morphin im Gehirn wurden durch Korrektur der applizierten Dosen mit Hilfe von Abb. 10 erhalten, unter Berücksichtigung des vorhandenen chronischen Morphins (vergl. Tab. 4) der verschiedenen Tiergruppen vor der akuten Morphinapplikation.Die Pfeile an der Abszisse zeigen die jeweiligen chronischen Morphinkonzentrationen an. Die erste Zahl der Codes gibt die Zahl der Pellets, die zweite die Implantationsdauer in Tagen an (Einzelheiten siehe Abb. 9).
unterer Teil: Doppelt reziproke (Lineweaver-Burk) Darstellung des linearen Teils der oben abgebildeten Kurven. Bei der gestrichelten Linie der 13/10 Gruppe wurden nur 2 Punkte herangezogen. Der K_D-Wert gibt die scheinbare Dissoziationskonstante für Morphin an.

Kehrwert der Affinität dar. Da dieser Wert offensichtlich bei allen Gruppen der gleiche ist und lediglich die Schnittpunkte auf der y-Achse (Maximalwerte) sich verändern, heißt das, daß die Affinität des Morphins sich mit zunehmender Toleranzentwicklung nicht verändert. Bildet man den Kehrwert dieses Punktes auf der x-Achse, so erhält man als Affinität für Morphin in Gehirnkonzentrationen ausgedrückt den Wert von 455 ng. Dieser Wert entspricht laut Eichkurve einem Wert von etwa 25 mg/kg. Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz heißt das, daß bei 25 mg/kg in naiven wie unterschiedlich toleranten Tieren jeweils ca. 50% der Gesamtrezeptoren besetzt sind (siehe Abb. 12).

3.6.2.4. Diskussion anhand einer sogenannten best-fit Computer Analyse der vorhandenen Daten.

Dieser so durch Verhaltensstudien ermittelte Affinitätswert für Morphin ist erstaunlich ähnlich dem Wert, den man durch direkte in vivo Rezeptorstudien erhält (siehe Bläsig et al., 1976), was die Richtigkeit dieses Befundes weiter erhärtet. Es besteht somit kaum mehr ein Zweifel darüber, daß eine Affinitätsverminderung des Morphins aufgrund qualitativer Rezeptorveränderungen keine große Bedeutung

Abb. 13: Schema zur Erläuterung der Toleranz. Der durch die Morphin/Rezeptorwechselwirkung ausgelöste Effekt wird bei zunehmender Toleranz durch einen nicht kompetitiven adaptativen Mechanismus beeinflußt.

für das Toleranzgeschehen spielt. Vielmehr scheinen dafür nicht kompetitive adaptative Mechanismen, die sich gegen die durch die Morphin/Rezeptorinteraktion ausgelöste Folgereaktion richten (siehe Abb. 13), verantwortlich zu sein. Dadurch kommt es zu einem zunehmenden Defizit der durch Morphin hervorgerufenen Zellantwort. Diese mit der Toleranz einhergehenden Veränderungen in der Beziehung zwischen Morphin und seiner über Rezeptoren mediierten Wirkung sollten noch klarer veranschaulicht werden. Dazu wurden unsere Meßdaten, die mit unserer - durch Verwendung lebender Tiere - limitierten Meßmethode nur Bruchstücke der wahren Dosis-Wirkungskurven lieferten, durch ein best/fit Computerprogramm optimiert und vervollständigt. Es wurden dazu alle

Meßpunkte jeder Kurve benutzt. Der Computer lieferte zu jeder Kurve jene Parameter (Wendepunkt und Maximaleffekt), bei denen die Summe aller Abweichungsquadrate am kleinsten war (siehe Abb. 14).

Die Verschiebung der Kurven, die mit der Verstärkung der Toleranz/Abhängigkeit einhergeht, zeigt die typischen Merkmale (siehe Simonis und Ariens, 1966), die auftreten, wenn die spezifischen Bindungsstellen kontinuierlich abnehmen, oder aber ein kontinuierlicher Verlust der intrinsischen Aktivität (siehe Ariens, 1954) des Agonisten bei unveränderter Rezeptorbindung stattfindet. Das heißt, die Maxima der Kurven, die entsprechend der einfachen Form des Massenwirkungsgesetzes ein Maximum der Rezeptorbesetzung anzeigen, nehmen kontinuierlich ab, wohingegen die Umkehrpunkte der Kurven, die die Affinität der Substanz anzeigen, sich in ihrer Lage auf der x-Achse nicht verändern. Wie dem gepunkteten Teil der Kurven zu entnehmen ist, existiert bei den naiven Tieren und der 1/4 Gruppe nach Unterdrückung des höchsten Schmerzreizes offensichtlich immer noch eine große Reserve nicht besetzter Rezeptoren. Dies deutet darauf hin, daß zur Erzielung der höchsten gemessenen analgetischen Wirkung (Unterdrückung des Schmerzes von 2 mA) nur ein Teil der Rezeptoren in den Tieren besetzt ist. Daraus läßt sich die scheinbare Rechts-Parallelverschiebung der gemessenen Konzentrations-Wirkungskurven (gefensterter ausgezogener Teil der Kurven) bei schwacher Toleranz erklären. Bei

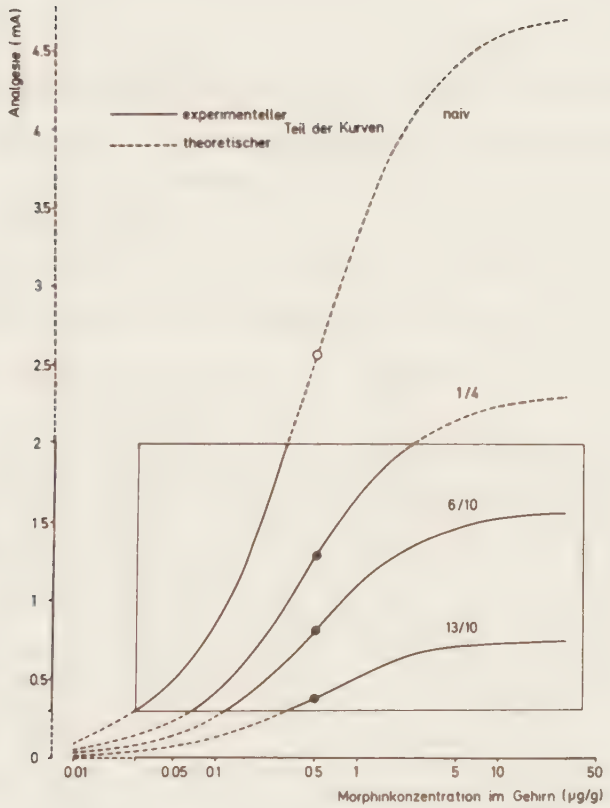


Abb. 14: Theoretische Konzentrations/Wirkungskurven, die aus den in Abb. 12a gezeigten Daten mittels einer best-fit Computer Analyse (siehe experimenteller Teil) errechnet wurden. Die durchgezogenen Linien geben den experimentell belegten Teil der Konzentration/ Wirkungskurven wieder, die gestrichelten Linien dagegen zeigen den extrapolierten Teil der Kurven. Die schwarzen Punkte markieren die Wendepunkte der Kurven, die gemäß dem Massenwirkungsgesetz die Dissoziationskonstante des Substanz-Rezeptor-Komplexes wiederspiegeln.

höherer Toleranz fällt die Wirkung maximaler Rezeptorbesetzung unter die Meßgrenze der vorliegenden Methode. Von da an bilden die Kurven meßbare Plateaus und es besteht eine direkte Proportionalität zwischen Rezeptorbesetzung und gemessener Wirkung. Halbmaximale Rezeptorbesetzung bzw. gemessene Wirkung werden bei Gehirnkonzentrationen von etwa 500 ng/g an Morphin erhalten (dies entspricht einer applizierten Dosis von 25 mg/kg); vollständige Rezeptorbesetzung wird etwa bei einer Gehirnkonzentration von 8 µg/g an Morphin erreicht (dies entspricht einer Dosis von 200-300 mg/kg).

Aus der graphischen Darstellung der Abb. 14 wird die einzigartige analgetische Wirksamkeit von Opiaten ersichtlich. Die Tatsache, daß offensichtlich zur Unterdrückung des stärksten in unseren Versuchen verwendeten Schmerzreizes von 2 mA nur ein Teil der Rezeptoren besetzt ist, deutet darauf hin, daß Morphin bei extremer Erhöhung der Dosis theoretisch in der Lage wäre, einen weit stärkeren Schmerz ebenfalls noch vollkommen zu unterdrücken. Zum anderen läßt sich aus der Abbildung sehr schön die bekanntermaßen enge Beziehung zwischen dem körperlichen Abhängigkeitspotential von Opiaten und deren agonistischer Potenz herleiten. Es ist somit leicht zu extrapolieren, daß z.B. eine komplette Neutralisierung der Wirkungen von Partialagonisten, deren Ausgangskurven schon in naiven Tieren flach sind und niedrige Maxima besitzen, weit schwächere adaptive Mechanismen

erfordert, als die Neutralisierung der Wirkungen des hier dargestellten reinen Agonisten Morphin.

3.6.3. Veränderungen im Verlauf von Dosis-Wirkungskurven für ein, durch einen Morphin-Antagonisten provoziertes, Entzugssymptom bei Zunahme der körperlichen Abhängigkeit.

3.6.3.1. Einleitende Bemerkungen

Morphinabhängige Nagetiere reagieren auf Morphinentzug mit einer normalerweise bei diesen Tieren nicht zu beobachtenden Verhaltensweise - einer stereotypen Springreaktion (das sogenannte Jumping). Dieses Entzugsspringen tritt besonders eindrucksvoll auf, wenn der Entzug durch Antagonisten provoziert wird. Seit der Beobachtung von Way et al. (1969), daß die das Entzugsspringen auslösende Antagonistendosis umgekehrt proportional zu dem zugrundeliegenden Grad der Abhängigkeit ist, wird die Empfindlichkeitszunahme für Antagonisten als ein quantitatives Maß für Morphinabhängigkeit angesehen. Bei solchen quantitativen Untersuchungen wird die Dosis von Naloxon ermittelt, welche bei 50% der Tiere eine Springreaktion auslöst. Bei dieser Methode handelt es sich um ein statistisches, sogenanntes quantales Verfahren, bei dem nicht die variable Stärke der Reizantwort mit der Reiz-auslösenden Antagonistendosis korreliert wird, sondern

der prozentuale Anteil der Tiere, die eine vorher wahlweise definierte Reizantwort zeigen.

Um eine genauere Vorstellung vom Verlauf der wahren Dosis-Wirkungskurven zu erhalten, wurden deshalb die Stärke der Reizantwort (Anzahl der Sprünge in einem bestimmten Zeitintervall) mit der Reiz-auslösenden Antagonistendosis korreliert. Wie weiter oben angeführt, eignen sich solche Kurven zu einer Rezeptoranalyse gemäß dem Massenwirkungsgesetz, was ja das Ziel dieser Untersuchung ist. Es wurden die gleichen Toleranz/Abhängigkeitsgrade wie in den vorhergehenden Versuchen wiederum durch Implantierung unterschiedlicher Morphinmengen sowie durch Variation der Gesamtdauer der Morphinverabreichung induziert.

3.6.3.2. Veränderungen der Dosis-Wirkungskurven für Naloxon-induziertes Jumping bei zunehmender Toleranz/Abhängigkeit.

An Ratten:

Wie aus der Abbildung 15 zu ersehen ist, verschieben sich die einzelnen Dosis-Wirkungskurven für Naloxon induziertes Jumping bei Ratten mit steigendem Abhängigkeitsgrad nach links in den Bereich niedriger Naloxondosen. Mit dieser Linksverschiebung ist jedoch ein Steilerwerden der Kurven und eine Zunahme des Maximaleffektes verbunden. Die

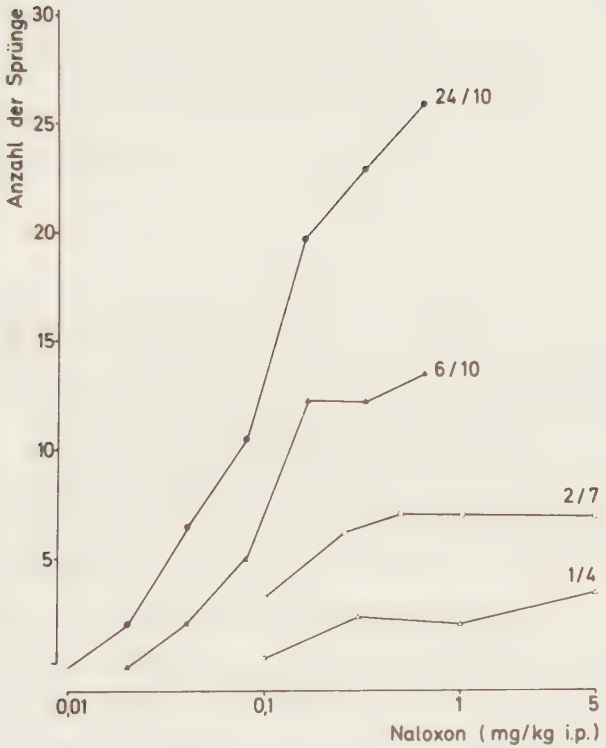


Abb. 15: Dosis-Wirkungskurven für Jumping bei Ratten mit unterschiedlichem Abhängigkeitsgrad. Unmittelbar nach Präzipitation des Entzugs mit Naloxon (Abszisse: mg/kg i.p.) ohne vorherige Entfernung der Morphin-Depot-Tabletten wurde die Anzahl der Sprünge (Ordinate) innerhalb der folgenden 10 Minuten gezählt. Die Indizes der Kurven geben die Anzahl der implantierten Morphin-Depot-Tabletten (siehe experimenteller Teil, Kap. 5.3.1.) (1. Zahl) und den Zeitraum der Pelletimplantation in Tagen (2. Zahl) an. Jeder Punkt gibt den Durchschnitt der Meßwerte bei 10 Ratten wieder.

Position der Maximaleffekte auf der x-Achse scheint von Kurve zu Kurve gleichzubleiben. Insgesamt sind diese Veränderungen genau entgegengesetzt jenen Veränderungen, die bei den Dosis-Wirkungskurven für Agonisten bei Zunahme der zugrundeliegenden Abhängigkeit zu beobachten waren.

An Mäusen:

Ganz ähnliche Ergebnisse zeigten sich, wenn man den gleichen Versuch mit Mäusen wiederholte. Diese Tiere zeigen ein viel ausgeprägteres Springverhalten als Ratten, weshalb versucht wurde,qualitativ ähnliche Ergebnisse mit dieser Spezies zu reproduzieren. Zur Induzierung unterschiedlicher Abhängigkeitsgrade wurde - im Gegensatz zu den Versuchen mit Ratten - nicht die Anzahl der implantierten Morphintabletten variiert sondern deren Morphingehalt (2,5; 5; 10; 75 mg Morphinbase), siehe Tab. 5. Am 4. Tag nach Implantation der Depottabletten wurde bei einem Teil dieser Tiere die Morphinkonzentration im Gehirn mit Hilfe der Gaschromatographie gemessen, um sicher zu sein, daß die unterschiedlichen Morphinmengen pro Depottablette tatsächlich zu höheren chronischen Morphinkonzentrationen geführt hatten; die übrigen Tiere wurden zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven verwendet (siehe unten).

Kode mg/Tage	2,5/4	5/4	10/4	75/4
Morphin-konzentra-tion im Gehirn ng/g	2.7±1.2	15.5±4	73.8±15	649.6±8.4

Tab. 5: Morphinkonzentration im Gehirn verschieden toleranter Mäuse.
Die Kodes geben verschiedene Muster der Toleranzinduzierung wieder, wobei die erste Zahl die Morphinmenge (mg) in jeder implantierten Morphin-Depot-Tablette wiedergibt, die zweite den Zeitraum (Tage) der Pelletimplantation.
Die Morphinkonzentrationen (ng/g) wurden mit der GC gemessen. Jeder Wert gibt den Durchschnittswert von Messungen an 6 Mäusen wieder.

Je höher die durch die Zunahme chronischer Morphinkonzentration im Gehirn bedingten Abhängigkeitsgrade waren (vergleiche Tab. 5), desto weiter waren die Kurven nach links verschoben, desto steiler waren sie und um so höhere Maxima hatten sie (siehe Abb. 16). Jedoch scheinen sich dabei die Maximaleffekte von Kurve zu Kurve in ihrer Position auf der x-Achse (ungefähr 1 mg/kg Naloxon) nicht zu verändern.

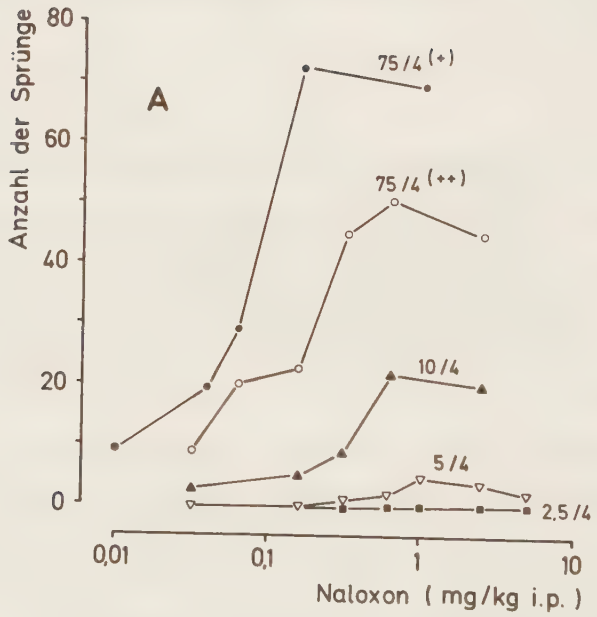


Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven für Jumping in Mäusen mit unterschiedlichem Abhängigkeitsgrad. Unmittelbar nach Präzipitation des Entzugs mit Naloxon (Abszisse: mg/kg i.p.) ohne vorherige Entfernung der Morphin-Depot-Tabletten wurde die Anzahl der Sprünge (Ordinate) innerhalb der folgenden 10 Minuten gezählt. Die Indizes der Kurven geben die Morphinmenge (mg) in jedem implantierten Morphin-Pellet (1. Zahl) und den Zeitraum der Pelletimplantation (2. Zahl) an. Jeder Punkt gibt den Durchschnitt der Meßwerte von wenigstens 10 Mäusen an. Die Tiere hatten vor der ersten Pelletimplantation ein Körpergewicht von 20 g (+) oder 30 g (++).

3.6.3.3. Diskussion.

Die den Kurven zugrundeliegenden Veränderungen in der Naloxon-Rezeptorwechselwirkung lassen sich mit Hilfe dieser Kurven nur schwer analysieren, da die verabreichten Dosen des Naloxons nicht die wahre Wirkkonzentration am Rezeptor wiederspiegeln. Das jeweils verabreichte Naloxon muß nämlich mit der zum Zeitpunkt des Versuches im Tier vorhandenen Morphinmenge um die Rezeptorbindungsstelle konkurrieren. Die Naloxonmenge im Rezeptorkompartment ist somit nicht nur eine alleinige Funktion der Hirnkonzentration des Naloxons sondern daneben auch eine Funktion der Konzentration des Agonisten. Es hätte somit zur Klärung der Frage nur wenig beigetragen, die wahren Hirnkonzentrationen des Naloxons zu ermitteln.

Es lassen sich aber auch ohne detaillierte Analyse der Daten einige Aussagen über die Art der Mechanismen machen, die der Gestaltsänderung der Naloxon-Dosis-Wirkungskurven zugrundeliegen. Die anscheinend unveränderte Position der Maximaleffekte auf der x-Achse spricht dagegen, daß eine Affinitätszunahme der Rezeptoren bei Naloxon eine entscheidende Rolle spielt. Nach dem einfachen Massenwirkungsgesetz tritt nämlich bei einer Affinitätszunahme eine parallele Linksverschiebung auf, was bedeutet, daß sich die gesamte Kurve einschließlich Maximum verschiebt. Die Kurven im vorliegenden Fall weisen aber vielmehr die typischen

Charakteristika von Kurven auf, die man erhält, wenn sich die Anzahl der Bindungsstellen für die Substanz oder die intrinsische Aktivität der Substanz erhöht (siehe Simonis und Ariens, 1966). Das heißt also, daß die Dosis-Wirkungskurven für Antagonisten ebenso wie die Kurven für Agonisten keinen Anhalt dafür bieten, daß sich die Bindungseigenschaften der spezifischen Opiatrezeptoren mit Zunahme der Toleranz/Abhängigkeit verändern.

Dagegen scheint sich im gleichen Maße wie die maximale Wirksamkeit des Agonisten nachläßt (siehe Kap. 3.6.2.) die maximale Wirksamkeit des Antagonisten zu erhöhen. Dieser Befund bestätigt die Annahme, daß Toleranz und Abhängigkeit komplementäre Erscheinungsformen ein und desselben zugrundeliegenden Mechanismus sind. Geht man nämlich davon aus, daß (wie die in Kapitel 3.6.2. beschriebenen Befunde erbrachten) die Wirkungen der Agonisten nicht durch Rezeptorveränderungen sondern durch gegenregulatorische nicht kompetitive Mechanismen des Effektorsystems zunehmend neutralisiert werden, und geht man ferner davon aus, daß der reine Antagonist Naloxon selbst unwirksam ist und seine Wirkung am toleranten Tier lediglich durch Verdrängung des Morphins vom Rezeptor und damit durch eine Demaskierung der der Morphinwirkung entgegengesetzten gegenregulatorischen Mechanismen zustande kommt, dann muß man genau jene Veränderung in der Gestalt von Naloxon-Dosis-Wirkungskurven fordern, welche

unsere Versuche gezeigt haben. Die beobachteten Veränderungen der Dosis-Wirkungskurven des Antagonisten bekräftigen somit eindeutig die Interpretation der mit Hilfe der Agonisten erhobenen Befunde.

3.6.4. Wirkung von Naloxon auf den Morphinspiegel im Gehirn naiver (d.h. nicht chronisch mit Morphin vorbehandelter) und tolerant/abhängiger Mäuse.

Einleitende Bemerkungen

Die in Kapitel 3.6.3. gezeigten Dosis-Wirkungskurven für das Naloxon induzierte Entzugssymptom Jumping lassen vermuten, daß die mit steigender Toleranz zu beobachtende Zunahme der Naloxonwirkung ein Anwachsen der den hemmenden Opiatwirkungen entgegengerichteten Kräfte im Effektorsystem der Zelle reflektiert, und nicht auf einer stärkeren Bindungsfähigkeit des Rezeptors für Naloxon beruht. Diese Befunde stehen im Widerspruch zu kürzlich veröffentlichten sensationellen Daten von Shen und Way (1975a,b), die von den Autoren mit einer Affinitätszunahme des Naloxons zum Rezeptor interpretiert wurden. Danach soll Naloxon bei toleranten, nicht jedoch bei naiven Tieren in der Lage sein, die Morphinkonzentration im Gehirn stark zu senken.

Nachdem die ausgearbeitete gaschromatographische Morphin-

bestimmungsmethode sich als sehr empfindlich und zuverlässig erwiesen hatte, bot es sich an, diese Befunde nicht nur mit dem von den Autoren benutzten Radioimmunoassay sondern auch mit der Gaschromatographie zu reproduzieren. Die Möglichkeit, daß es sich bei den Ergebnissen um methodische Artefakte des Radioimmunoassays handelt, wäre durch eine Parallelbestimmung mit einer anderen Methode auszuräumen.

Da die Ergebnisse direkt mit denen von Shen und Way (1975a,b) verglichen werden sollten, wurden die gleiche Tierspezies, der gleiche Versuchsaufbau sowie die gleichen Extraktions- und Analysenmethoden verwendet. Selbst das beim RIA verwendete Morphin-Antiserum zeigte eine ähnliche Spezifität und Avidität wie das von Shen und Way (1975a,b) verwendete Serum. Um den eventuellen Einfluß des Extraktionsverfahrens auf die Ergebnisse besser abschätzen zu können, wurde neben der von den Autoren benützten Extraktion von Morphin mit organischen Lösungsmitteln (Kupferberg et al., 1964) noch eine Säureextraktion angewandt (siehe experimenteller Teil, Kap. 5.2.2.).

Wie in den vorhergehenden Versuchen wurde auch bei diesem Experiment die Toleranz und Abhängigkeit durch Implantation von Morphin-haltigen Depot-Tabletten unter die Rückenhaut der NMRI Mäuse erzeugt. Kontrollversuche an naiven Tieren, die bei dem von Shen und Way (1975a,b) beschriebenen

Experiment fehlten, wurden ebenfalls durchgeführt. Alle verwendeten Tiere wurden durch Dekapitation getötet, das Gehirn wurde danach so schnell wie möglich entnommen, in Aluminiumfolie eingepackt und bis zur weiteren Aufarbeitung tiefgefroren. Für Parallelbestimmungen wurden die Gehirne längs in zwei Hälften geteilt, so daß die Morphinkonzentration der einen Hälfte mittels der GC and die der anderen Hälfte mit dem RIA analysiert werden konnte. Als Kontrolle dienten bei jedem Versuch Gehirne von Mäusen, denen physiologische Kochsalzlösung anstelle des Naloxons injiziert wurde. Bezüglich methodischer Einzelheiten siehe Kap. 5.2. und 5.3.1.

a) Naive Tiere

Zu Beginn der Versuche wurden die gruppenweise aufgeteilten Mäuse mit steigenden Morphindosen (1;2,5;5;15 mg/kg) intravenös injiziert, wobei die Tiere jeder einzelnen Gruppe (mit jeweils 8 Tieren) immer dieselbe Morphinkonzentration appliziert bekamen. 15 Minuten nach der Morphingabe erhielt jeweils die eine Hälfte jeder Tiergruppe 10 mg/kg Naloxon intraperitoneal, während die andere physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle injiziert bekam. Nach weiteren 15 Minuten wurden die Tiere durch Dekapitation getötet.

Wie die gaschromatische Bestimmung der Morphingehirnkonzentration zeigte, führt die Applikation steigender Morphindosen zu einem annähernd proportionalen Anstieg der Morphin-

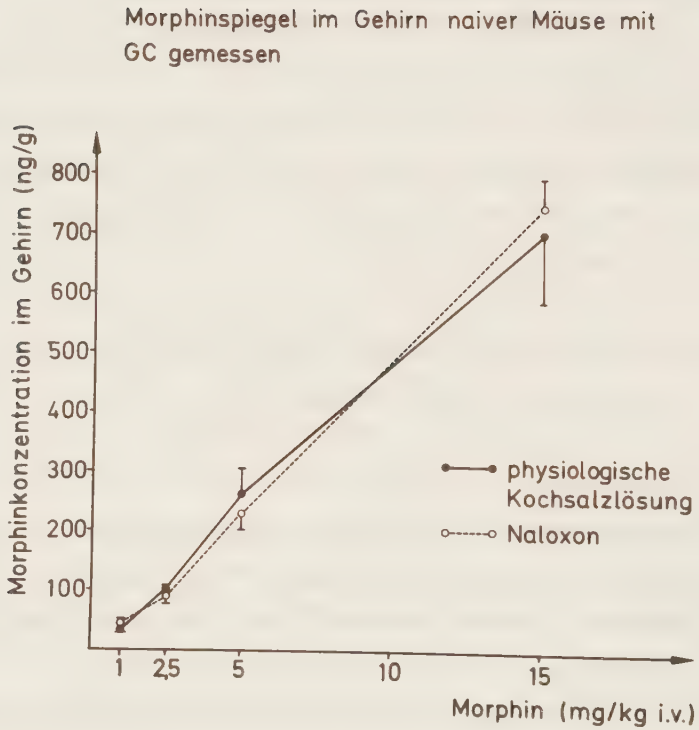


Abb. 17: Morphinkonzentration im Gehirn naiver Mäuse. Den Tieren wurden steigende Mengen an Morphin i.v. appliziert (Abszisse, mg/kg) und nach 15 Minuten entweder Naloxon (o--o, 10 mg/kg i.p.) in 200 µl oder die entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung (●—●) injiziert. Weitere 15 Minuten später wurden die Tiere getestet und die Morphinkonzentrationen im Gehirn (Ordinate, ng/g) gaschromatographisch bestimmt, siehe experimenteller Teil, Kap. 5.2.1. Jeder Punkt gibt den Durchschnittswert von Messungen an 5-6 Mäusen wieder.

konzentrationen im Gehirn (Abb. 17). Vorhergehende Verabfolgung des Morphinantagonisten hatte dabei keine signifikante Wirkung auf den Morphinspiegel im Gehirn.

b) Tolerante Tiere

Bei diesen Versuchen wurden die in 5 Gruppen zu je 12 Tieren aufgeteilten toleranten Mäuse zu verschiedenen Zeiten (0, 2, 4, 6 und 8 Stunden) nach Entfernung der implantierten Morphintabletten getötet. Jeweils 15 Minuten vor dem Töten bekamen 6 Tiere jeder Gruppe 10 mg/kg Naloxon bzw. als Kontrolle physiologische Kochsalzlösung i.p. injiziert. Die Bestimmung der Morphinkonzentration im Gehirn wurde sowohl mit der GC als auch mit dem RIA durchgeführt, nachdem alle Gehirne in der schon oben beschriebenen Weise geteilt worden waren.

Abb. 18 zeigt, daß es nach der Entnahme der Morphintabletten zu einem stetigen Absinken der Morphinkonzentration im Gehirn kommt, und daß innerhalb von 8 Stunden eine Abnahme des Morphinspiegels von etwa 300 ng/g auf ungefähr 18 ng/g Gehirn stattgefunden hat. Wie sich auch aus der Abbildung ersehen läßt, zeigen die mit dem RIA und der GC gemessenen Morphinwerte eine sehr gute Übereinstimmung. Bei keiner der Methoden ist ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Naloxon behandelten Tieren und den Kontrolltieren nachzuweisen.

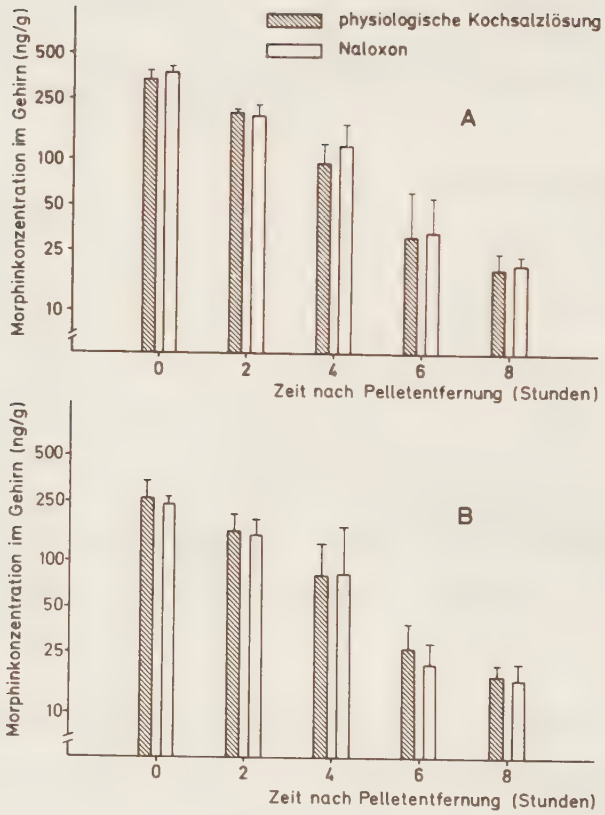


Abb. 18: Morphinkonzentrationen im Gehirn toleranter Mäuse in Abhängigkeit der Zeit nach Pelletentfernung. Die Morphinkonzentrationen wurden mit dem RIA, Abb. 18A, und mit der GC, Abb.18B, gemessen. 15 Minuten vor dem Töten erhielten die Tiere entweder Naloxon (10 mg/kg, i.p., 200 µl □) oder physiologische Kochsalzlösung (200 µl ▨) injiziert. Jede Säule gibt den Durchschnittswert von Messungen an 10-12 Mäusen mit der Standardabweichung an. Abszisse: Zeit (Stunden) nach der Pelletentfernung, Ordinate: Morphin-Gehirn-Konzentrationen (ng/g). Einzelheiten siehe experimenteller Teil.

Zur Überprüfung der bisherigen Ergebnisse wurde noch eine Morphinextraktion mit Säure hinzugezogen, der sich eine Messung mit dem RIA anschloß. Doch auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Naloxon-behandelten Tieren und Kontrolltieren nachgewiesen werden (siehe Tab. 6).

Zeit nach Pelletentfernung (Stunden)	tolerante Tiere vorbehandelt mit	
	physiol. Kochsalzlsg.	Naloxon
0	293 ± 14 ng/g	293 ± 3 ng/g
4	47 ± 34 ng/g	50 ± 13 ng/g
6	16 ± 14 ng/g	16 ± 11 ng/g

Tab. 6: Morphinkonzentration im Gehirn toleranter Mäuse in Abhängigkeit der Zeit nach Pelletentfernung. Die Versuche wurden analog zu denen, wie in Legende zu Abb. 18 beschrieben, durchgeführt. Im Gegensatz zu Abb. 18A wurde Morphin aus den Gehirnen mit Säure (anstelle mit organischen Lösungsmitteln) extrahiert. Die anschließenden Messungen erfolgten wie in Abb. 18A mit dem RIA.

Vergleicht man aber die Morphinkonzentrationen, die nach den beiden unterschiedlichen Extraktionsverfahren zu messen waren, so zeigen sich deutliche Unterschiede in der Höhe der einzelnen Konzentrationen (vergleiche Abb. 18 mit Tab. 6). Diese Diskrepanz läßt sich wahrscheinlich damit erklären, daß beide Versuchsanordnungen zu verschiedenen Tageszeiten

an unterschiedlichen Mäusegruppen durchgeführt worden waren.

In den bisher wiedergegebenen Versuchen wurde nur der Zeitpunkt der Messung nach Pelletentfernung, nicht jedoch der Zeitpunkt nach Naloxongabe variiert. Das heißt, die Morphin-Gehirnspiegel wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Pelletentfernung aber immer 15 Minuten nach Naloxonverabfolgung gemessen. Um eine eventuelle Verdrängung des Morphins bei den toleranten Tieren auch zu einem anderen Zeitpunkt nach Naloxongabe ausschließen zu können, wurden Versuche durchgeführt, in denen Tiere zu unterschiedlichen Zeiten (5, 15, 30 und 60 Minuten) nach der Naloxoninjektion getötet wurden. Dazu wurden neben jeder mit Naloxon vorbehandelten Gruppe (6 Tiere) jeweils 6 Kontrolltiere untersucht, die physiologische Kochsalzlösung i.p. erhalten hatten. In enger Anlehnung an den Versuch von Shen und Way wurden die Mäuse 5 Stunden nach Pelletentnahme getötet, zu einem Zeitpunkt also, in dem die Morphinkonzentration in einen sehr niedrigen Bereich abgesunken ist (siehe Abb. 18). Nach Shen und Way ist dies eine Voraussetzung dafür, eine mögliche Morphinverdrängung durch Naloxon sichtbar zu machen. Aus Abb. 19 ist zu ersehen, daß zu diesem Zeitpunkt die Morphinkonzentration im Gehirn zwischen 50 und 100 ng/g Gehirn liegt.

Doch auch in diesem Versuch war mit keiner der beiden angewandten Analysenmethoden ein signifikanter Unterschied zwischen Naloxon-vorbehandelten und Kontrolltieren festzustellen.

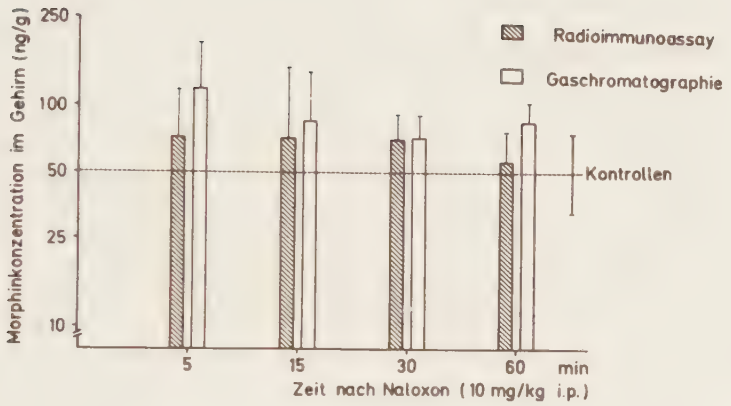


Abb. 19: Morphinkonzentrationen im Gehirn toleranter Mäuse 5 Stunden nach Pelletentfernung. Die Tiere erhielten Naloxon (10 mg/kg, i.p. in 200 µl) oder physiologische Kochsalzlösung (200 µl) zu verschiedenen Zeitintervallen vor dem Töten (Abszisse, Minuten). Die Morphinkonzentrationen wurden sowohl mit RIA (▨) als auch mit GC (□) gemessen. Die Morphinkonzentrationen der mit physiologischer Kochsalzlösung vorbehandelten Kontrolltiere (30 Mäuse) liegen auf der gestrichelten Linie. Jede Säule gibt den Durchschnittswert von Messungen an 10-12 Mäusen mit den Standardabweichungen wieder. Die Gruppen zeigen untereinander keinen signifikanten Unterschied ($p > 0.05$). Ordinate: Morphin-Gehirnkonzentration (ng/g).

Diskussion

Die Ursache der Diskrepanz zwischen unseren und den von Shen und Way (1975a,b) beschriebenen Befunden ist insofern unerklärlich, da wir nicht nur den gleichen Versuchsaufbau wie die Autoren sondern ebenfalls ein vergleichbares Antiserum verwendet hatten, so daß auch die Antikörperspezifität nicht für die Unterschiede verantwortlich zu sein scheint. Da auch die zwei voneinander unabhängigen Bestimmungsmethoden für Morphin, die Gaschromatographie und der Radioimmunoassay, in sämtlichen Parallelbestimmungen übereinstimmten, können methodische Artefakte ausgeschlossen werden.

Selbst wenn wir die Befunde von Shen und Way (1975a,b) hätten nachvollziehen können, hätten wir uns nie ihrer Interpretation anschließen können. Denn nach der allgemein vorherrschenden Meinung läßt sich nur spezifisch gebundene Substanz verdrängen, deren Konzentration jedoch im Verhältnis zur unspezifisch gebundenen so niedrig ist, daß eventuelle Veränderungen weder mit dem RIA noch mit der GC hätten erfaßt werden können. Das heißt, daß Konzentrationsunterschiede in dem Ausmaß, wie sie von Shen und Way (1975a,b) berichtet worden sind, in gar keinem Fall mit einer Affinitätsveränderung des Naloxons zum Rezeptor zu erklären sind.

4. ABSCHLIESSENDE DISKUSSION

Zur Untersuchung der Frage, inwieweit qualitative und/oder quantitative Veränderungen an den Opiatrezeptoren für die Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit verantwortlich zu machen sind, war es notwendig,eine Methode auszuarbeiten, die eine exakte Bestimmung sehr kleiner Morphinkonzentrationen im Gehirn ermöglicht. Die dafür entwickelte und optimierte gaschromatographische Bestimmungsmethode zeigte beim Vergleich mit einem Radioimmunoassay (RIA) für Morphin, daß die Gaschromatographie (GC) in Hinsicht auf Empfindlichkeit wie auch Spezifität dem zur Verfügung stehenden RIA deutlich überlegen war. Es wurden daher alle hier beschriebenen Experimente, in denen die Morphin-Rezeptor-Interaktion untersucht wurde, ausschließlich mit Hilfe der GC durchgeführt; nur in den Versuchen, in denen die einschlägigen Befunde von Shen und Way (1975a,b) reproduziert werden sollten, wurde auch der RIA eingesetzt.

Die durchgeführten in vivo Versuche sprechen gegen die Hypothese, daß qualitative Veränderungen der Opiatrezeptoren für die durch chronische Morphinverabfolgung bewirkte Toleranz und Abhängigkeit verantwortlich sind. Die Experimente waren dabei so angelegt, daß sowohl Veränderungen in der Bindung von Agonisten als auch von

Antagonisten hätten erfaßt werden müssen.

Es wurden Verhaltensstudien durchgeführt, die darüber Aufschluß geben sollten, ob sich bei toleranten Tieren die Rezeptoraffinität für Agonisten verändert. Hierbei wurden Dosis-Wirkungskurven für Morphin-induzierte Analgesie an naiven Ratten und Ratten unterschiedlichen Toleranzgrades miteinander verglichen. Mit steigendem Toleranzgrad zeigte sich dabei eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven in den Bereich höherer Dosen; die dabei gleichzeitig auftretende Abflachung der Dosis-Wirkungskurven und das Absinken der Maximaleffekte lassen sich nicht durch Veränderungen der Bindungseigenschaften der Rezeptoren erklären.

Voraussetzung für die Zulässigkeit dieses Schlusses war jedoch der Nachweis, daß die Konzentration von Morphin im Gehirn der Tiere proportional der verabfolgten Dosis ansteigt. Es wurden daher die in den einzelnen Versuchen vorliegenden Morphin-Gehirnkonzentrationen direkt bestimmt. Somit war es möglich, die Dosis-Wirkungskurven in Konzentrations-Wirkungskurven umzurechnen und die gemessenen Wirkungen direkt mit Rezeptorbesetzung in Verbindung zu bringen.

Gestützt werden die mittels systemischer Morphinverabfolgung

erzielten Ergebnisse durch den Befund, daß eine ähnliche Abflachung der Dosis-Wirkungskurven auch beobachtet wurde, wenn der Agonist - in diesem Fall Etorphin - intraventrikulär verabreicht wurde.

Die Analyse der Dosis-Wirkungskurven nach Lineweaver Burk ergab, daß diese Veränderungen der Dosis-Wirkungsbeziehungen nicht auf einer Verminderung der Affinität der Agonisten zum Rezeptor beruhen, sondern auf das Vorhandensein eines antagonistischen, nicht-kompetitiven Mechanismus zurückzuführen sind. Zu der gleichen Aussage führte eine 'best fit' Computeranalyse der Daten.

Weitere Versuche befaßten sich mit der Frage, ob möglicherweise die Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit mit einer Veränderung der Affinität der Rezeptoren für Morphinantagonisten einhergeht. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Dosis-Wirkungskurven für das Entzugssymptom Jumping (Entzugsspringen) erstellt. Es zeigte sich, daß mit steigendem Grad der Toleranz die Dosis-Wirkungskurven nach links, d.h. in den Bereich niedriger Naloxondosen, verschoben werden. Diese Linksverschiebung ging mit einem Steilerwerden der Kurven und mit einer Zunahme der maximal erzielbaren Wirkung einher. Auch in diesem Falle sprechen die Charakteristika der Kurven gegen die Hypothese, daß die Steigerung der Wirksamkeit des Naloxons bei der

Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit durch Affinitätsveränderungen der Rezeptoren bedingt ist. Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz hätte eine parallele Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven erwartet werden müssen. Vielmehr weisen die beobachteten Veränderungen in die gleiche Richtung wie die Veränderungen der Dosis-Wirkungskurven der Agonisten: sie lassen vermuten, daß die dem Toleranz/Abhängigkeitsgeschehen zugrundeliegenden Veränderungen nicht auf der Ebene der Rezeptorbindung, sondern in dem nachgeschalteten Effektorsystem stattfinden und nicht kompetitiver Natur sind.

In weiteren Versuchen sollten die zu diesen Schlüssen in Widerspruch stehenden Befunde von Shen und Way (1975a,b) reproduziert werden. Hierbei wurde die Beeinflussung der Morphinkonzentration im Gehirn naiver und toleranter Tiere durch den Morphinantagonisten Naloxon untersucht. Die genannten Autoren hatten bei toleranten Mäusen, nicht aber bei naiven Mäusen, eine Verminderung des Morphingehaltes im Gehirn durch Naloxon gefunden; sie interpretierten dies im Sinne einer Zunahme der Affinität des Naloxons zum Rezeptor unter chronischer Morphineinwirkung. Bei Verwendung der gleichen Tierspezies, des gleichen Versuchsaufbaus, sowie identischer Extraktions- und Analysenmethode, konnte weder bei toleranten noch bei naiven Tieren eine Verminderung des Morphingehaltes im Gehirn nach Naloxonverabfolgung

gefunden werden. Das gleiche (negative) Ergebnis hatten Versuche, wenn die Morphinkonzentration im Gehirn mit Hilfe einer zweiten Methode, der Gaschromatographie, bestimmt wurde. Es war somit nicht möglich, die Befunde von Shen und Way nachzuvollziehen.

Nach Beendigung dieser Experimente berichteten auch andere Autoren (Catlin et al., 1977), daß sie die Befunde von Shen und Way nicht reproduzieren konnten.

Wenn auch die Befunde insgesamt qualitative Veränderungen der Opiatrezeptoren als Ursache des Toleranz- und Abhängigkeitsgeschehens so gut wie ausschließen, so lassen sie doch die Möglichkeit offen, daß chronische Opiateinwirkung mit einer quantitativen Veränderung der Rezeptoren einhergeht. So kann die hier vorgenommene Analyse der Dosis-Wirkungskurven nicht unterscheiden, ob sich die Anzahl der Bindungsstellen für Agonisten vermindert hat (bzw. die Bindungsstellen für Antagonisten vermehrt hat) oder die beobachteten Veränderungen lediglich das Effektorsystem betreffen, d.h. die Folgereaktionen, welche durch die Pharmakon-Rezeptor-Interaktion ausgelöst werden.

Mit quantitativen Rezeptorveränderungen könnte die allgemein akzeptierte (und auch durch unsere Befunde bestätigte) Annahme kaum erklärt werden, daß Toleranz und Abhängigkeit

komplementäre Erscheinungsformen ein und desselben Grundgeschehens darstellen. Mittels einer Verminderung der Bindungsstellen für Agonisten könnte zwar das Phänomen der Toleranz erklärt werden, nicht jedoch das der Abhängigkeit. Andererseits könnte mit einer Vermehrung der Bindungsstellen für Antagonisten zwar die Empfindlichkeitszunahme gegenüber diesen Substanzen erklärt werden, nicht jedoch, warum diese Antagonisten überhaupt in der Lage sind, am toleranten Tier Entzugsphänomene auszulösen. Diese Überlegungen sprechen ganz entscheidend dafür, daß die durch chronische Opiateinwirkung ausgelösten Veränderungen nicht im Rezeptorsystem sondern im Effektorsystem zu suchen sind.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1. Verwendete Materialien und Substanzen

Die in diesen Untersuchungen verwendeten Substanzen waren:

Morphin-HCl (Merck, Darmstadt)

Naloxon-HCl (Endo-Laboratories, Brüssel, Belgien)

Nalorphin-HCl (C.H. Boehringer Sohn, Ingelheim)

Morphin-3-glucoronid (Research Triangle Institute, Research Triangle Park, North Carolina)

Kodeinphosphat (Merck, Darmstadt)

Morphinantiserum (Don H. Catlin, Department of Pharmacology, University of California, Los Angeles)

Etorphin (Reckitt & Colman, Kingston-upon-Hull, England)

Pentafluoropropionsäureanhydrid (PFPA) (Pierce Chemical Co)

Silyl 8 (Pierce Chemical Co)

NCS tissue solubilizer (Amersham, Searle, USA)

Unisolve I (Zinsser, Germany)

Alle weiteren nicht extra aufgeführten Chemikalien stammen von der Firma Merck, Darmstadt.

Die Lösungen werden, wenn nicht anders angegeben, mit doppelt glasdestilliertem Wasser hergestellt, Injektionslösungen mit physiologischer Kochsalzlösung. Die Konzentrationsangaben bei Injektionslösungen beziehen sich auf das Gewicht der freien Basen.

5.2. Methoden der Analysen

5.2.1. Gaschromatographie

Extraktion und Probenvorbereitung:
Alle Extraktionsschritte wurden in Glasgefäßen durchgeführt, die in kochender Salpetersäure gereinigt und anschließend silanisiert wurden.

Die Gehirne, die von männlichen Sprague-Dawley-Ratten oder männlichen NMRI-Mäusen stammten, wurden nach Entnahme bis zu ihrer Extraktion bei -30°C gelagert. Kurz vor der Analyse wurde jedes Gehirn einzeln gewogen und nach Zugabe von 100 µl Nalorphin (interner Standard) in eiskalter 0.4 N Perchlorsäure (bei Rattengehirn 2 g in 3 ml, bei Mäusegehirn 0,4 g in 1,5 ml) homogenisiert. Nach Zentrifugation der einzelnen Gehirnhomogenate (20 Minuten bei 7700 g in der Sorvall RC-5 Zentrifuge) wurden 200 µl jedes Überstandes mit einem 3 M Karbonat-Puffer (pH 9) auf pH 9 eingestellt und zur Extraktion von Morphin mit 6 ml einer Mischung von Toluol-Butanol (9:1) 30 Minuten lang bei 20°C mechanisch geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation der Proben (5 Minuten bei 1600 g in der Sorvall RC-3) wurde die obere organische Phase abgehoben und je 500 µl zu einer 0,1 M Schwefelsäure pipettiert. Die Proben wurden dann 15 Minuten bei 20°C geschüttelt und - wie oben beschrieben - zentrifugiert. Nach Abpipettieren der oberen organischen Phase wurde die wässrige

Phase mit 3 M Karbonatpuffer (pH 9) auf pH 9 eingestellt und mit 3 ml Toluol-Butanol (9:1) versetzt. Die Proben wurden wieder 15 Minuten bei 20°C geschüttelt und anschliessend zentrifugiert. Danach wurde die organische Phase abgetrennt und bei 70°C mit nachgereinigtem Stickstoff bis zur Trockne eingedampft. Zur Derivatisierung wurde der Rückstand in 50 µl getrocknetem Äthylacetat und 100 µl Pentafluoropropionsäureanhydrid aufgenommen. Die fest zugestöpselten Gläser wurden kurz auf dem Vortex-Mixer geschüttelt und im Heizblock bei 60°C 30 Minuten lang erhitzt. Der Überschuß an Reagenz wurde anschließend zusammen mit dem Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft und der verbleibende Rückstand in 100 µl trockenem Äthylacetat gelöst. Von dieser Lösung wurden pro Analyse 3-7 µl in den Gaschromatographen eingespritzt.

Bei Morphinkonzentrationen im unteren Nanogramm-Bereich erfolgte die Homogenisation der Rattengehirne (ca. 2 g) in 1,5 ml Perchlorsäure und die der Mäusegehirne (ca. 0,4 g) in 0,75 ml. Vom Überstand wurden nach Zentrifugation 200-400 µl zur Extraktion mit organischen Lösungsmitteln verwendet, bei dem das Verhältnis von wässriger zu organischer Phase,wie oben beschrieben, konstant gehalten wurde. Die einzelnen Proben wurden analog behandelt; zusätzlich wurde jedoch eine Reextraktion von der Schwefelsäure in die organische Phase durchgeführt und zur Konzentrierung der Probe der nach der Derivatisierung erhaltene Rückstand in 50 µl

Äthylacetat aufgenommen.

Zur Ermittlung der internen Standardkurven (siehe Kap. 3.3.2.) wurden neben der Perchlorsäure noch steigende Mengen an Morphin und 100 µl Nalorphin-Standardlösung (80 ng, 200 ng, bzw. 800 ng) zum Gehirn gegeben, das von unbehandelten Tieren verwendet, die nur mit Perchlorsäure versetzt wurden. Die sich anschließende Homogenisation, Extraktion, Derivatisierung und Messung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Die externen Standardkurven (siehe Kap. 3.3.2.) ließen sich aus den Meßwerten errechnen, die nach der Derivatisierung und Messung von bekannten Morphin- und Nalorphinkonzentrationen ohne vorherige Extraktion erhalten wurden.

Chromatogramm und Auswertung:
Die gaschromatographischen Bestimmungen wurden in einem Hewlett-Packard Gaschromatographen (Modell 5750) durchgeführt, der mit einem ^{63}Ni-Elektroneneinfangdetektor ausgestattet war. Die Trennungen erfolgten in einer silanisierten 6 Fuß x 2 mm langen Glassäule, die mit 3% OV-17 auf Gas Chrom Q gefüllt war.

Die GC-Bedingungen waren:

Durchflußgeschwindigkeit des Trägergases:
Helium (25 ml/Min.)
Durchflußgeschwindigkeit des Spülgases :
Argon/Methan 10% (25 ml/Min.)
Einspritzblock : 245°C
Säule : 210°C
Detektor : 230°C

Die Berechnungen der Peakflächen erfolgten durch einen elektronischen Integrator, wobei Empfindlichkeit und Werte für Integrationsbeginn und -ende eines Peaks (Einstellung der Steigung) sowie für die automatische Background-Korrektur den einzelnen Messungen angepaßt wurden.

5.2.2. Radioimmunoassay

Extraktion und Probenvorbereitung:

Die Extraktion von Morphin aus dem Gehirn von Mäusen erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden.

1) Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (Shen und Way, 1975a,b, in Anlehnung an Kupferberg et al., 1964). Die Homogenisation (unter Verwendung eines Elvin-Potters) des Mäusegehirns (0,4 g) wurde in einer Mischung von 10 ml eiskaltem n-Butanol-Chloroform (1:10) und 2 ml eiskalter gesättigter Natriumhydrogenkarbonat-Lösung durchgeführt. Nach der Zentrifugation (10 Minuten bei 7700 g in Sorvall RC-5) wurden 8 ml der organischen Phase in Zentrifugengläser pipettiert, die 1,2 ml von einer 0.01 N Schwefelsäure enthielten. Nach dem Schütteln (1 Minute) und

Zentrifugieren (10 Minuten bei 1500 g in Sorvall RC-5) der Gläser wurden 3 x 0,1 ml der wässrigen Phase für spätere Dreifachbestimmungen abgenommen.

2) Extraktion mit Salzsäure (persönliche Mitteilung von D.H. Catlin, University of California, Los Angeles). Ein Mäusegehirn (ca. 0,4 g) wurde in 1,2 ml einer 0.01 N Salzsäure homogenisiert (Elvin-Potter). Nach dem Zentrifugieren (20 Minuten bei 7700 g in Sorvall RC-5) wurden 3 x 0,1 ml des Überstandes für die nachfolgenden radioimmunologischen Dreifachbestimmungen abgenommen.

Bindungsnachweis und Auswertung:

Zur Bestimmung der ^{3}H-Morphin-Antikörper-Bindung wurde ein Antiserum aus Kaninchen (hergestellt von D.H. Catlin) und hoch markiertes Morphin (spezifische Aktivität 22 Ci/mMol) verwendet. Dabei wurden die Meßproben (á 0,1 ml) in Reaktionsgefäße gegeben, die 50 µl ^{3}H-Morphin (2,27 pMol) und 400 µl des Antiserums (Titer 1:100 nach Gehirnextraktion mit Butanol/Chloroform und 1:200 nach Gehirnextraktion mit Salzsäure) enthielten (siehe Tab. 1 bzw. 2), das mit 0.05 M Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) und 10%igem normalem Kaninchenserum verdünnt war. Die Lösungen wurden gut durchmischt und anschließend 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert; danach wurde der Antikörper mit gebundenem ^{3}H-Morphin zusammen mit den anderen Proteinen durch Zugabe 500 µl kalter gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung präzipitiert. Nach Schütteln (30 Sekunden) wurde 30 Minuten bei 2°C weiter inkubiert.

Anschließend wurde abzentrifugiert (10 Minuten bei 6000 g in Beckman-Zentrifuge), der Überstand entfernt und der Niederschlag mit 500 µl einer 50%igen kalten gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen. Nach erneutem Schütteln (15 Sekunden) wurde wieder zentrifugiert (10 Minuten bei 6000 g in Beckman-Zentrifuge), der Überstand entfernt, der Niederschlag in 1 ml NCS tissue solubilizer gelöst und in ein Zählglas pipettiert, das 10 ml Unisolve I enthielt. Die Radioaktivität wurde 5-10 Minuten lang in einem Packard Tricarb Scintillation Spectrometer gezählt.

Zur Ermittlung der internen Standardkurven (siehe Kap. 3.4.1.) wurden bekannte Morphinmengen zur Inkubationsmischung gegeben, die Gehirnextrakte unbehandelter Mäuse enthielt.

Zur Berechnung der Ausbeute wurden unterschiedliche Mengen Morphin vor der Extraktion zu den Gehirnen gegeben (siehe Kap. 3.4.1.).

Die maximale Serumbindung jeder Standardkurve ergab sich aus dem gebundenen Anteil des markierten ^{3}H-Morphins in Abwesenheit von unmarkiertem Morphin; die unspezifische Bindung wurde für jedes Experiment gemessen, in dem das Morphinantiserum durch verdünntes Serum unbehandelter Kaninchen ersetzt wurde.

Zur Messung der Spezifität der Bindung zwischen Morphin und Antiserum wurden statt des unmarkierten Morphins unterschiedliche Konzentrationen an unmarkierten Morphinabkömmlingen zum Inkubationsansatz gegeben (siehe Kap. 3.4.2.).

5.3. Tierversuche

5.3.1. Entwicklung von körperlicher Abhängigkeit bzw. Toleranz

In einigen Experimenten wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem anfänglichen Körpergewicht von 170-200 g verwendet. Jeweils fünf Tiere wurden in einem Käfig gehalten. Im Falle von Mäusen als Versuchstiere wurden NMRI-Mäuse (25 -30 Gramm) verwendet, die jeweils zu zehnt in einem Käfig gehalten wurden. Beiden Tierarten standen Wasser und Trockenfutter ad libidum zur Verfügung. - Abhängigkeit bzw. Toleranz wurde durch Implantation von Morphin-Depottabletten (Pellets) unter die Rückenhaut während Ätheranästhesie erzeugt. Diese Applikationsform bewirkt eine konstante langsame Resorption des Morphins und somit einen gleichmäßig hohen Morphinspiegel ohne nächtlichen Entzug. Bei Ratten wurden verschiedene Abhängigkeits- bzw. Toleranzgrade dadurch erreicht, daß a) die Anzahl der implantierten Morphin-Depot-Tabletten, b) die Zeitintervalle zwischen den Implantationen und c) die Länge des Implantationszeitraumes variiert wurden. "1/4 Gruppe": die

Ratten erhielten 1 Depottablette (durch die 1. Zahl des Kodes angezeigt) und wurden 4 Tage später (durch die 2. Zahl des Kodes angezeigt) untersucht. "6/10" Gruppe: die Ratten erhielten 1 Tablette am 1. Tag, 2 Tabletten am 4. Tag und 3 Tabletten am 7. Tag; am 10. Tag erfolgte die Messung. "13/10" Gruppe: die Ratten erhielten 1 Tablette täglich an 5 aufeinander folgenden Tagen, und 2 Tabletten täglich vom 6.-9. Tag; am 10. Tag wurden sie untersucht. "24/10" Gruppe: die Ratten erhielten 1 Tablette am 1. Tag, 2 Tabletten am 2. Tag und 3 Tabletten täglich vom 3.-9. Tag und wurden am 10. Tag untersucht (siehe Bläsig et al., 1973).

Ausbildung von Toleranz bzw. Abhängigkeit in Mäusen wurde durch Implantation von einem Pellet bewirkt. Sollten unterschiedliche Toleranzgrade erzeugt werden, so wurde der Morphingehalt pro Pellet verändert. Drei Tage nach der Implantation des Pellets wurde der Entzug bzw. der Vokalisationstest durchgeführt.

Die Morphin-Depot-Tabletten (Pellets) wurden von einer nach Gibson und Tingstad (1970) beschriebenen Rezeptur hergestellt. Ein Standardpellet bestand aus 75 mg Morphinbase, 75 mg Mikrokristalline Cellulose (Avicel), 0,75 mg gefällte Kieselsäure $SiO_2 x H_2O$ = Aerosil) und 1,5 mg Calciumstearat. - Den Kontrolltieren wurden Placebopellets, welche nur die Trägersubstanzen enthielten, implantiert.

5.3.2. Messung der Toleranz anhand der antinozeptiven Wirkung des Morphins

Die Methode zur Messung der antinozeptiven Wirkung des Morphins wurde erstmals von Caroll und Lim (1960) beschrieben und später von Hoffmeister (1968) modifiziert. Hierbei wurde den Tieren durch elektrische Reizung der Schwanzwurzel mit einer Doppelelektrode nach Luckner und Magun (1951) Schmerz zugefügt. Den "Elektroschock" lieferte ein Konstantstromgerät, das Rechteckimpulse mit einer Dauer von 10 msec, einer Frequenz von 50 Hz über einen Zeitraum von 2 sec abgab. Die Stromstärke konnte zwischen 100 und 2000 Mikroampere variiert werden. Auf die elektrische Reizung reagierten die Tiere mit einer starken motorischen Abwehr und mit Schreien. Für die hier beschriebenen Versuche wurden nur die akustischen Äußerungen als Schmerzreaktion gewertet. Unter Morphin erhöhte sich die Schwelle dosisabhängig, bei der dieses Schreien ausgelöst wurde. Waren die Tiere aber tolerant gegenüber der Morphinwirkung, waren größere Dosen notwendig, um eine Erhöhung der Schmerzschwelle zu erreichen. - Dieser Vokalisationstest wurde an naiven und chronisch abhängigen bzw. toleranten Ratten und Mäusen durchgeführt. Bei Ratten erfolgte die Messung 60 Minuten, bei Mäusen 45 Minuten nach der Morphininjektion.

5.3.3. Messung des Entzugssymptoms Jumping

Während des Entzugsexperiments saßen die Ratten oder Mäuse in Acrylglaskäfigen. Unmittelbar nach Präzipitation des Entzugs mit Naloxon, das i.p. gespritzt wurde, wurde die Anzahl der Sprünge innerhalb der folgenden 10 Minuten gezählt.

5.3.4. Intraventrikuläre Injektion

Metallkanülen wurden unter Pentobarbital-Anästhesie in den linken lateralen Gehirnventrikel implantiert. 3 Tage später erfolgte die Implantation der 1. Morphin-Depot-Tablette. Die Etorphin-Injektionen, deren Volumen immer 10 µl betrug, wurden mittels Mikrospritzen appliziert. Zum Zeitpunkt des Maximaleffektes, also 20 Minuten nach Etorphingabe, wurden die Messungen durchgeführt.

5.3.5. Auswertung mit Hilfe einer best-fit Computer Analyse

Die best-fit Computer Analyse der Daten (siehe Kap. 3.6.2.) wurde mit einem Hewlett-Packard-Rechner (Modell 9810) durchgeführt.

Es wurde angenommen, daß die Wechselwirkungen zwischen Pharmakon und Rezeptor den Gesetzmäßigkeiten des einfachen Massenwirkungsgesetz unterliegen:

$$y = \frac{\alpha}{1 + \frac{K_D}{x}}$$

oder bei Verwendung von logarithmischen Dosen, um symmetrische, s-förmige Kurven zu erhalten:

$$y = \frac{\alpha}{1 + 10^{\log K_D - \log x}}$$

Dabei bedeutet y die gemessene Antwort (mA) und x die Gehirnkonzentration (µg/g) zur Zeit der Messung. α und K_D geben die Kurvenparameter wieder, wobei α den Maximumeffekt und K_D den Wendepunkt der Kurven darstellt. Nach dem Massenwirkungsgesetz gibt K_D die Dissoziationskonstante des Substanz-Rezeptor-Komplexes wieder. Die Kurvenparameter wurden aus den rohen Daten (dazu wurden sämtliche vorhandene Punkte jeder Kurve verwendet) mit dem nachfolgenden best-fit Verfahren ermittelt: für jede Datengruppe wurde eine willkürliche Anzahl von hypothetischen Kurven berechnet. Die tatsächlichen Daten wurden dann mit diesen hypothetischen

Kurven verglichen, indem alle Abweichungsquadrate addiert wurden. Ausgewählt wurden dann diejenigen theoretischen Kurven, bei denen die Summe aller Abweichungsquadrate am kleinsten war.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Chronische Zufuhr von Morphin und anderen morphinähnlich wirkenden Substanzen (Opiate) führt zu verringerter Empfindlichkeit des Organismus für diese Pharmaka, d.h. zu Toleranz und zur Entwicklung von Abhängigkeit des Organismus von diesen Substanzen. Diese körperliche Abhängigkeit äußert sich bei Unterbrechung der weiteren Zufuhr der Opiate oder bei Applikation von Opiatantagonisten im Auftreten von Entzugserscheinungen.

Ziel dieser Arbeit war,einen Beitrag zu liefern zu der Frage, inwieweit qualitative und/oder quantitative Veränderungen der Opiatrezeptoren für die Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit verantwortlich sind.

Eine wesentliche Voraussetzung bei der Bearbeitung dieses Themas war die Verfügbarkeit über Meßmethoden, welche die Bestimmung kleinster Morphinkonzentrationen im Gehirn gestatten. Es wurde die gaschromatographische Bestimmungsmethode optimiert und mit der radioimmunologischen Methode verglichen. Die Gaschromatographie zeigte letztlich höhere Spezifität und höhere Empfindlichkeit als der Radioimmunoassay. Allerdings mußte hierbei eine aufwendigere Extraktion mit nachfolgender Derivatisierung in Kauf genommen werden.

Mit Hilfe dieser Bestimmungsmethoden wurden eine Reihe verschiedener in vivo Studien über die Interaktion von Morphin mit den Morphinrezeptoren durchgeführt. Hierbei sollte geklärt werden, ob sich die Affinität der Agonisten oder Antagonisten zum Rezeptor nach chronischer Opiateinwirkung verändert.

1. Zur Erzeugung von Toleranz und Abhängigkeit wurde Ratten eine steigende Anzahl von Morphin-Depottabletten unter die Haut implantiert. Mit zunehmender Toleranz nahm die einer bestimmten Morphin-Gehirnkonzentration entsprechende Analgesie kontinuierlich ab. Die Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zeigte nicht nur eine Verschiebung in den Bereich höherer Morphinkonzentration sondern auch eine zunehmende Abflachung der Wirkungskurven.
   Auch intraventrikulär verabreichtes Etorphin bewirkte bei den toleranten Ratten eine ähnliche Abflachung der Dosis-Wirkungskurven.
   Die Analyse der Gestaltsveränderung der Konzentrations-Wirkungskurven nach Lineweaver Burk ergab, daß die Wirkungsabnahme nicht durch eine Verminderung der Affinität der Opiate zum Rezeptor bedingt ist, sondern auf einen nicht-kompetitiven, antagonistischen Mechanismus beruht.

2. Parallel mit der Abnahme der Wirkung der Agonisten beim toleranten Tier nahm die Wirkung der Antagonisten zu; diese Zunahme wurde anhand des Entzugsspringens an tolerant/abhängigen Ratten quantitativ bestimmt. Es kam zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurven bei gleichzeitiger Erhöhung der maximalen Wirkung.

   Die spiegelbildlichen Veränderungen der Dosis-Wirkungskurven für die durch Agonisten bewirkte Analgesie (Rechtsverschiebung mit Abflachung) und die durch Antagonisten ausgelöstes Entzugsspringen (Linksverschiebung mit Steilerwerden der Kurven) verdeutlichen, daß Toleranz und Abhängigkeit komplementäre Erscheinungsformen ein und desselben Basalmechanismus darstellen.

3. Die mit diesen Schlüssen nicht in Einklang stehenden Ergebnisse von Shen und Way (1975a,b) konnten nicht reproduziert werden; dies gelang auch nicht, wenn zur Bestimmung der Morphinkonzentration neben dem Radioimmunoassay auch noch die gaschromatographische Methode herangezogen wurde. Mit keiner der beiden Methoden konnte der von den Autoren beschriebene Abfall der Morphinkonzentration im Gehirn toleranter Mäuse nach Naloxoninjektion bestätigt werden.

7. LITERATUR

Adler, T.K., H.W. Elliot and R. George, 1957: Some factors affecting the biological disposition of small doses of morphine in rats. J. Pharmacol. exp. Ther. 120: 475

Andes, M.W., G.I. Mannering, 1962: New peak-shift technique for gas liquid chromatography. Preparation of derivatives on the column. Anal. Chem. 34: 730

Ariens, E.J., 1954: Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. Part I, Problems and Theory. Arch. Int. Pharmacodyn 99: 32

Axelsson, I. and S. Thesleff, 1959: A study of supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle. J. Physiol. Lond., 178

Bläsig, J., A. Herz, K. Reinhold and S. Zieglgänsberger, 1973b: Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats. Psychopharmacologica (Berl.) 33: 19

Bläsig, J., V. Höllt, G. Meyer and A. Herz, 1976: Relationship between tolerance to morphine and occupation of specific binding sites by morphine, opiates and endogenous opioid peptides. Proc. Internat. Narcotics Res. Club Meeting (North Holland Publ. Comp., Amsterdam) 391-394

Brochmann-Hanssen, E. and A.B. Svendsen, 1962: J. Pharm. Sci. 51: 1095

Brochmann-Hanssen, E. und A.B. Svendsen, 1963: J. Pharm. Sci. 52: 1134

Carrol, M.N. and R.K.S. Lim, 1960: Observations on the neuropharmacology of morphine and morphinelike analgesics. Arch. Int. Pharmacodyn. 125: 135

Catlin, D.H., M.B. Liewen and M.C. Schaeffer, 1977a: Brain levels of morphine in mice following removal of a morphine pellet and naloxone challenge: No evidence for displacement. Life Sci. 20: 133

Clarke, E.G.C., 1959: Microchemical identification of some modern analgesics. Bull. Narc. 11: 27

Clarke, E.G.C. and M. Williams, 1955: Bull. Narc. 7: 33

Collier, H.O.J., 1966: Tolerance, physical dependence and receptors. Adv. Drug Res. 3: 171

Dahlström, B. and L. Paalzow, 1975: Quantitative determination of morphine in biological samples by gas-liquid chromatographie and electron capture detection, J. Pharm. Pharmacol. 27: 172

Davis, M.E., T. Akera and T.M. Brody, 1975: Saturable binding of morphine to rat brain-stem slices and the effect of chronic morphine treatment. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol., Vol. 12, 3: 409

Dum, J., J. Bläsig, G. Meyer and A. Herz, 1978: Opiate antagonist-receptor interaction unchanged by acute or chronic opiate treatment, im Druck.

Ebbinghausen, W.O.R., I.H. Mowat, P. Vestergaard and N.S. Kline, 1973: Stable isotope method for the assay of codeine and morphine by Gas chromatography-Mass Spectrometry. A feasibility study. Adv. in Biochem. Psychopharmacology 7: 135

Ehrlich-Rogozinsky, S. und N.D. Cheronis, 1963: Michrochem. J. 7: 336

Elison, C. and H.W. Elliott, 1964: Studies on the enzymatic N- and O-demethylation of narcotic analgesics and evidence for the formation of codeine from morphine in rats and dogs. J. Pharmac. exp. Ther. 144: 265

Elliott, H.W., N. Nomof, K. Parker, M.L. Dewey and E.L. Way, 1964: Clin. Pharmac. Ther. 5: 405

Felber, J.P., 1974: Radioimmunoassay of polypeptide hormones and enzymes. Methods of Biochemical Analysis, Vol. 22, p. 1-94

Fujimoto, J.M., E.L. Way and C.H. Hine, 1954: A rapid method for the estimation of morphine. J. Lab. and Clin. Med. Vol. 44, 4: 627

Gates, M. and G. Tschudi, 1952: The synthesis of morphine. J. Amer. Chem. Soc. 74: 1109

Gibson, R.D. and Y.E. Tingstad, 1970: Formulation of morphine implantation pellet suitable for tolerance-physical dependence studies in mice. J. Pharm. Sci. 59: 426

Gintzler, A.R., E. Mohacsi and S. Spector, 1976: Radioimmunoassay for the simultaneous determination of morphine and codeine. Europ. J. Pharmacol. 38: 149

Goldstein, A., 1974: Interaction of narcotic antagonists with receptor sites. Narcotic antagonist, ed. by M.C. Brande, L.S. Harris, E.L. May, L.D. Smith and J.E. Villareal. Advances in Biochemical Psychopharmacology, Vol. 8, Raven Press, New York

Goldstein, D.B. and A. Goldstein, 1961: Possible role of enzyme inhibition and repression in drug tolerance and addiction, Biochem. Pharmacol. 8: 48

Gulland, J.M. and R. Robinson, 1925: Constitution of codeine and thebain. Mem. Proc. Manchester Lit. Phil. Soc. 69: 79

Himmelsbach, C.K., 1943: Symposium: Can the europhoric analgetic and physical dependence effects of drugs be separated? With reference to physical dependence. Fed. Proc. 2: 201

Höllt, V. and M. Wüster, 1978: The opiate receptors. In: Developments in Opiate Research (A. Herz, Ed.) pp. 1-65, Marcel Dekker, Inc., New York

Hoffmeister, F., 1968: Tierexperimentelle Untersuchungen über den Schmerz und seine pharmakologische Beeinflussung. Editor Cantor, Aulendorf

Ikekawa, N., K. Takayama, E. Hosoya and T. Oka, 1969: Determination of morphine in urine by gas chromatography. Anal. Biochem. 28: 156

Jaffe, J.H. and Sharpless, 1968: The addictive states. Ass. in Research in nervous and mental desease. A.J. Wickler, ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 46: 226

Kalant, H., A.E. Le Blanc and R.J. Gibbins, 1971: Tolerance to, and dependence on, some non-opiate psychotropic drugs. Pharmacol. Rev. 23: 135

Kitano, R. and A.E. Takemori, 1977: Enhanced affinity of opiate receptors for naloxone in striatal slices of morphine dependent mice. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 18: 341

Kupferberg, H., A. Burkhalter and E.L. Way, 1964: A sensitive fluorometric assay for morphine in plasma and brain. J. Pharmac. exp. Ther. 145: 247

Kuschinsky, K., 1977: Opiate dependence. Progress in Pharmacology, Vol. 1, No 2

Lineweaver, H. and D. Burk, 1934: J. Am. Chem. Soc. 56: 658

Lukner, M. and R. Magun, 1951: Eine Methode zur quantitativen Prüfung analgetischer Wirkungen im Tierversuch. Z. ges. exp. Med. 117: 133

Mulé, S.I., 1964: Determination of narcotic analgesics in human biological materials. Analyt. Chem. 36: 1907

Mulé, S.I. and L.A. Woods, 1962: Distribution of N-C^{14}Methyl labelled morphine: I. in central nervous system of non-tolerant and tolerant dogs. J. Pharmac. exp. Ther. 136: 232

Nakamura, G.R., 1960: Chromatography of monoacetyl-morphine and acetylcodeine. Bull. Narc. 12: 17

Nicolau, G., G. van Lear, B. Kaul and B. Davidow, 1977: Determination of morphine by electron capture gas-liquid chromatography. Clin. Chem. 23, 9: 1640

Schild, H.O., 1949: pA_x and competitive drug antagonism. Brit. J. Pharmacol. 4: 277

Schmerzler, E., W. Yu, M.I. Hewitt and I.J. Greenblatt, 1966: Gas chromatographic determination of codeine in serum and urine. J. Pharm. Sci. 55: 155

Schmidt, C.F. and A.E. Livingston, 1933: The action of morphine on the mammalian circulation. J. Pharmacol. exp. Ther. 47: 411

Sertürner, F.W.A., 1806: Darstellung der reinen Mohnsäure (Opiumsäure) nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neu entdeckten Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen. J. Pharm. Ärzte, Apoth. Chem. 14: 47

Shen, J.W. and E.L. Way, 1975a: Displacement of morphine from the brain during antagonist precipitated abstinence. Comm. on problems of drug dependence (NAS-NRC) 37th Ann. Scientific Meeting, 635

Shen, J.W. and E.L. Way, 1975b: Antagonist displacement of brain morphine during precipitated abstinence. Life Sci. 16: 77

Shuster, L., 1961: Repression and de-repression of enzyme synthesis as a possible explanation of some aspects of drug action. Nature 189: 314

Siminoff, R. and P.R. Saunders, 1958: J. Pharmacol. 124: 252

Simonis, A.M. and E.J. Ariens, 1966: Eine Molekulargrundlage für die Wirkung von Pharmaka, 2. Teil: Verschiedene Typen von Antagonisten. Arzneimittelforschung 16: 1393

Sine, H.E., N.P. Kubasik and J. Woytash, 1973: Simple gas-liquid chromatographic method for confirming the presence of alkaloids in urine. Clin. Chem. 19: 340

Smith, A.A., R. Albin and M. Crofford, 1976: Heterogeneity of receptors for analgesia, respiration and lenticular effect. In: Opioids and endogenous Opioid Peptides (H.W. Kosterlitz, ed.) pp. 289-294. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Snyder, S.H., 1975: Opiate receptor in normal and drug altered brain function. Nature 257: Sept. 18.

Spector, S., 1971: Quantitative determination of morphine in serum by radioimmunoassay. J. Pharmac. exp. Ther. 178: 253

Spector, S. and C.W. Parker, 1970: Morphine radioimmunoassay. Science 168: 1347

Stewart, C.P., A. Stolman, 1961: eds. "Toxicology" Vol. 2, chap. 7. Academic Press, New York

Street, H.V., 1967: Gas liquid chromatography of submicrogram amounts of drugs III. Analysis of alkaloids in biological media. J. Chromatogr. 29: 68

Szerb, J.D., D.P. Mac Leod, F. Moya and D. Mc Curdy, 1957: Determination of morphine in blood and tissue. Arch. Int. Pharmacodyn. 109: 99

Takemori, A.E., 1968: An ultrasensitive method for the determination of morphine and its application in experiments in vitro and in vivo. Biochem. Pharmacol. 17: 1627

Takemori, A.E., 1974: Narcotic antagonist. Adv. in Biochem. Psychopharmacol. 8: 335

Takemori, A.E., T. Oka and N. Nishiayama, 1973: Alteration of analgesic receptor-antagonist interaction induced by morphine. J. Pharmacol. exp. Ther. 186: 261

Taylor, J.F., 1971: In: Narcotic Drugs. Biochemical Pharmacology, Ed. D.H. Clouet, Plenum Press, New York, London, p. 17

Theiss, P., A. Herz und J. Bläsig, 1974: Vergleich der Entwicklung der Morphinabhängigkeit und Morphintoleranz bei Ratten. Arzneim. Forsch. (Drug Research) 24: 1014

Tulunay, F.C. and A.E. Takemori, 1974a: The increased efficacy of narcotic antagonists induced by various narcotic analgesics. J. Pharmacol. exp. Ther. 190: 395

Tulunay, F.C. and A.E. Takemori, 1974b: Further studies on the alteration of analgesic receptor antagonist interaction induced by morphine. J. Pharmacol. exp. Ther. 190: 401

Wallace, J.E., J.D. Biggs and K. Blum, 1972: Gas-liquid and thin-layer chromatographic technique for determining morphine in urine. Clin. Chim. Acta. 36: 85.

Wallace, J.E., H.E. Hamilton, K. Blum, P. Clayton, 1974: Determination of morphine in biological fluids by electron capture gas-liquid chromatography. Analytical Chemistry 46, 14: 2107

Way, E.L., J.W. Kemp, J.M. Young and D.R. Grassetti, 1960: Pharmacological effects of heroin in relation to its rate of biotransformation. J. Pharmacol. 129: 144

Way, E.L., H.H. Loh and F.H. Shen, 1969: Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. J. Pharmacol. exp. Ther. 167: 1

Wilkinson, G.R. and E.L. Way, 1969: Sub-microgram estimation of morphine in biological fluids by gas-liquid chromatography. Biochem. Pharmacol. 18: 1435

Wong, C.-L. and G.A. Bentley, 1978: Increased antagonist potency of naloxone caused by morphine pretreatment in mice. Europ. J. Pharmacol. 47: 415

Woods, L.A., J. Cochin, E.G. Fornefield and M.H. Seevers, 1954: J. Pharmacol. 111: 64

Yeh, S.Y., 1973: Separation and identification of morphine and its metabolites and congeners. J. Pharm. Sci. 62: 1827

Yeh, S.Y. and L.A. Woods, 1970: Determination of radioactive-labelled codeine, morphine, dehydromorphine, and their metabolites in physiological materials. J. Pharm. Sci. 59: 380.

LEBENSLAUF

Gabriele Meyer	geboren am 7.3.1950 in Kiel als Tochter des Landeszentralbankrats Herbert Meyer (verstorben 1963) und seiner Ehefrau Ursula, geb. Kirschke.
Schulbildung	1956 - 1960 Volksschule in Kiel, Flensburg und Lübeck 1960 - 1968 Neusprachliches Gymnasium in Lübeck
Reifeprüfung	Juni 1968 in Lübeck
Berufsausbildung	
Praktikantenzeit	1968 - 1970 Rathaus-Apotheke in Stockelsdorf
Pharmazeutisches Vorexamen	Juli 1970 in Kiel
Studium der Pharmazie	SS 1971 - WS 1971/72 Universität Passau SS 1972 - SS 1974 Universität München
Pharmazeutisches Staatsexamen	Mai 1974 in München
Promotion	Seit Oktober 1974 Ausführung der vorliegenden Doktorarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Herz an der Neuropharmakologischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie.